

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**Avaliação do envolvimento do receptor dectina-1 na
atividade fungicida e na produção de metabólitos do
oxigênio por neutrófilos e monócitos humanos
desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis***

Juliana Carvalho de Quaglia e Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu – SP

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Avaliação do envolvimento do receptor dectina-1 na atividade fungicida e na produção de metabólitos do oxigênio por neutrófilos e monócitos humanos desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Juliana Carvalho de Quaglia e Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, como exigência para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Silva, Juliana Carvalho de Quaglia E.

Avaliação do envolvimento do receptor dectina-1 na atividade fungicida e na produção de metabólito do oxigênio por neutrófilos e monócitos humanos desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Juliana Carvalho de Quaglia E Silva. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luciane Alarcão Dias-melicio
Capes: 21102007

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Fungicidas. 3. Fagocitose. 4. Monócitos. 5. Neutrófilos.

Palavras-chave: Atividade fungicida; Monócitos e Neutrófilos; *Paracoccidioides brasiliensis*; Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂); Receptor Dectina-1.

Dedico esse trabalho à minha família.

Por sempre saber, fazer e ser exatamente tudo aquilo

que eu preciso, até quando nem eu mesma sei.

Minha gratidão por vocês serem da maneira que são não

tem fim! Amo muito vocês!

Agradecimentos

“...E é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá...”

Ana Jácomo, ao escrever essa frase, traduz perfeitamente o que sinto nesse momento. Seria impossível ter chegado aqui sem a participação, o apoio, a paciência, o carinho, de cada um.

Por isso, **agradeço...**

Primeiramente à minha orientadora Luciane Alarcão Dias-Melicio, por abrir as portas para que eu pudesse confirmar que estava realmente no caminho certo quando me apaixonei e escolhi minha área, por confiar em mim para a condução desse projeto e pelo suporte em todas as oportunidades que tive.

Especialmente à Amanda (Para), que na primeira semana de convivência já deixou de ser apenas uma colega de laboratório para se tornar uma verdadeira companheira! De experimentos diurnos e noturnos, de aprendizados, de confidências, de risadas, de questionamentos, de almoços, de sentimentos, de viagens, de vida! Conheço poucas sintonias tão boas quanto essa, que me faz acreditar que nada é por acaso e que a vida nos proporciona exatamente aquilo que mais precisamos nos momentos mais adequados! Serei eternamente grata!

À professora Angela M. V. C. Soares e ao pessoal do Laboratório de Imunologia da Paracoccidioidomicrose (Dpto. de Imunologia IBB Unesp Botucatu), Tati, Régis e Dani, pelo acolhimento, por todos os ensinamentos e pelos salvamentos nas horas de crise!

Aos vizinhos de lab. “moaníssimos”, Bruna, Carol (Mãe), Gabriel, Laura e Natália, que me receberam tão bem, fazendo eu me sentir a vontade logo de início, divertindo meus dias, me ensinando, compartilhando assuntos sérios e muita bobagem também!

Às meninas do lab., Isabella e Luciana, que chegaram depois, e mesmo com pouco tempo de convivência, já partilharam a rotina, os almoços, os aprendizados, além de terem sido muito importantes para a condução dos trabalhos!

Aos funcionários dos departamentos de Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu!

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemonúcleo Regional de Jaú, Hospital Fundação Amaral Carvalho, na cidade de Jaú – SP e ao Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia e Microbiologia – IBB Unesp Botucatu, pelas análises realizadas.

A todos que doaram o sangue por esse trabalho, literalmente!

À minha família “botocuda”: meus doutores preferidos, Daniel (Baygon) e Fernanda (Sovs) e minha parceira pra toda vida, Nina (Casquinho). Fundamentais pra me manter aqui em Botucatu, mais que só colegas de casa, irmãos! Não tenho palavras que descrevam minha gratidão por tudo que vivemos juntos!

Aos meus companheiros da XLVI, André (Dói), Mayara (Coli), Priscila (Mics), Luiz Antonio (Ades), Leandro (Raider), por todos os momentos de cumplicidade nesses anos, e em especial às minhas Carols, (Judi e Kly), por compartilharmos desde o início os nossos sentimentos, medos, alegrias, decepções, amores, desesperos, risadas, ressacas, vitórias, sem nunca perder a fé de que tudo ia dar certo, tinha que dar (e deu!)

E também a toda “Biomed XLVI”, a turma ao mesmo tempo difícil e prazerosa de se ter convivido!

À Aline (Dendê), Patrícia (Son), Maura (Tchimi), aos TipoReis, ao Yama (Felipe) e muitos outros veteranos e colegas de ano, que me receberam tão bem e me acolheram quando tudo ainda era novo e de certa forma assustador, me dando a segurança de que podia construir uma vida, criar laços incríveis e ter vários dos melhores anos da minha vida aqui!

Aos meus pais, Sérgio e Claudia, e minha irmã Vivianne, por serem mais que família, serem meus melhores amigos, confidentes, professores, cozinheiros, médicos, mecânicos, costureiros, psicólogos, mágicos, videntes, palhaços, músicos, massagistas, engenheiros, motoristas, ou qualquer outra coisa que preciso. Por serem sempre meu porto seguro, meu colo preferido, meu melhor espelho, minha maior base. Por construírem comigo o que sou hoje e servirem de exemplos para a pessoa que quero me tornar e família que vou construir amanhã! Por me ensinarem o que é amor verdadeiro e incondicional, do qual tenho maior orgulho do mundo em mostrar e fazer parte! Que a reciprocidade dos sentimentos seja suficiente para explicar, pois só as palavras não são!

As minhas avós e avôs, às tias e tios, primos e primas, de sangue ou de coração, por todos os mimos, rezas, “marmitas”, caronas, receitas, dormidas, dinheirinhos, rifas, por toda a preocupação e presença, física ou não, que com certeza fizeram toda a diferença! Amo-os com toda força!

Aos melhores amigos e amigas que alguém poderia ter! Os de sempre e pra sempre, os da infância, os que chegaram depois e ficaram, os que passaram... Quem é, sabe! Pelos cuidados, abraços, fotos, conselhos, piadas, fofocas, diversões... Por todas as

baladas, viagens, churrascos, dormidas, passeios, ócios coletivos, por fazer nada, mas estar sempre juntos! Saber que os encontraria dali alguns dias, muitas vezes era o que me fazia aguentar a semana! Mesmo com a distância e com as rotinas diferentes, por saber que por maior que fosse o tempo longe, ainda podia contar e quando nos encontrássemos tudo ainda era como antes e até melhor!

À FAPESP, pelo apoio e bolsa concedida!

A todos que direta ou indiretamente, de perto ou de longe, muito ou pouco, fizeram parte desses últimos quatro anos tão importantes da minha vida!

“...Uma fé genuína na preciosidade da vida. Sinto que tudo em mim se reorganiza, silenciosamente, o tempo todo. Que isso tem mais a ver com o meu olhar, com a natureza das sementes que rego, do que eu possa perceber. Minha expectativa, tantas vezes ansiosa, de que as coisas sejam diferentes, dá lugar à certeza tranqüila de que, naquele momento, tudo está onde pode estar. Em vez de sofrer pelas modificações que ainda não consigo, eu me sinto grata pelas mudanças que já realizei. E relaxo...”

Ana Jácomo

Sumário

1. Resumo	11
2. Introdução	13
3. Objetivos	21
4. Casuística, Materiais e Métodos	22
5. Resultados	30
5.1 Avaliação da ação do IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre a expressão de dectina-1 em monócitos e neutrófilos	30
5.2 Avaliação da ação do receptor dectina-1 sobre a recuperação fúngica e produção de peróxido de hidrogênio	34
5.3 Avaliação da ação do receptor dectina-1 sobre a produção de peróxido (H ₂ O ₂) de hidrogênio de monócitos e neutrófilos	38
6. Discussão	41
7. Conclusão	50
8. Referências bibliográficas	51

1. Resumo

Estudos têm demonstrado que o reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata, denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Assim, a interação entre moléculas de superfície dos patógenos e receptores homólogos, presentes na membrana celular de fagócitos, modulam a fagocitose e a ativação celular. Trabalhos têm demonstrado ainda a importância da estimulação de receptores toll-like 2 e 4 (TLR2 e TLR4), receptores de manose (MR) e dectina-1 de fagócitos, tanto em infecções bacterianas como fúngicas, culminando ou não com indução de mecanismos microbicidas, bem como a produção de várias citocinas. O reconhecimento fúngico via dectina-1 pode induzir uma série de respostas celulares protetoras contra fungos. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram: 1) Avaliar a expressão do receptor dectina-1 em monócitos e neutrófilos humanos ativados com diferentes citocinas, e desafiados *in vitro* com *P. brasiliensis*; e 2) Avaliar a participação do receptor dectina-1 sobre a atividade de monócitos e neutrófilos humanos ativados com diferentes citocinas, e desafiados *in vitro* com *P. brasiliensis*, por meio da avaliação da recuperação fúngica e da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Assim, monócitos e neutrófilos de indivíduos normais tratados ou não *in vitro* com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, foram desafiados com o *P. brasiliensis* (Pb 265), seguindo-se a análise da expressão do receptor dectina-1 pela técnica de citometria de fluxo, a recuperação fúngica através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e produção de H₂O₂ nas culturas celulares desafiadas com o fungo. Nossos resultados demonstraram que tanto a cepa avirulenta do *P. brasiliensis*, bem como os tratamentos com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF induziram aumento na expressão desse receptor em

monócitos. Os tratamentos das culturas de monócitos e neutrófilos com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF promoveram diminuição na recuperação de fungos viáveis dessas culturas, bem como aumento na produção de peróxido de hidrogênio. No entanto, ao tratarmos as culturas com anticorpo monoclonal anti-dectina-1, para bloqueio da ligação do *P. brasiliensis* ao receptor, identificamos diminuição na produção de H₂O₂ e aumento na recuperação fúngica. Esse efeito foi observado em todas as culturas tratadas com o anticorpo monoclonal específico de bloqueio. Esses resultados demonstram o envolvimento desse receptor no reconhecimento fúngico e sua participação na indução dos mecanismos efetores contra o *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Monócitos e neutrófilos; *Paracoccidoides brasiliensis*; Receptor dectina-1, Atividade fungicida; Peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

2. Introdução

Dentre as micoses sistêmicas, a paracoccidioidomicose encontra-se restrita aos países da América Latina, sendo endêmica em algumas regiões do Brasil (Brummer *et al.*, 1993; Blotta *et al.*, 1999). A infecção fúngica tem como agente etiológico o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), um fungo imperfeito e dimórfico, que se desenvolve como levedura *in vivo* nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado a 37° C em meios de cultura enriquecidos e, na forma de micélio, à temperatura ambiente, com variação de 4 a 28°C (Restrepo *et al.*, 2005). A infecção provavelmente ocorre por meio da inalação de propágulos do fungo que alcançam os pulmões causando lesões locais, que podem aí permanecer ou disseminar-se via linfo-hematogênica para outros órgãos como baço, fígado, adrenais, medula óssea, pele e mucosas (Franco *et al.*, 1987; Brummer *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependerão de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica, das condições ambientais e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, patrimônio genético e o mais importante, sua capacidade de desenvolver uma resposta imune (Franco *et al.*, 1993). Em relação a este último fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos inespecíficos e específicos de defesa que atuam na resistência ao *P. brasiliensis* (Franco *et al.*, 1993, Calich *et al.*, 1994; Musatti *et al.*, 1994; Peraçoli *et al.*, 1995).

A imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos, constituindo-se na primeira linha de defesa contra infecções, já que

reconhece um largo espectro de patógenos sem necessidade de sensibilização prévia. Além disso, a ativação da resposta imune inata desencadeia a produção de uma rede de citocinas, resultando em uma resposta inflamatória e podendo ser um pré-requisito para o desencadeamento da imunidade adquirida (Akira *et al.*, 2001; Kokkinopoulos *et al.*, 2005).

Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência ao *P. brasiliensis*, destacando-se a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida. Em células da imunidade inata, o reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares presentes na membrana celular de macrófagos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que ao interagirem com moléculas específicas de superfície do parasita, os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), modulam a fagocitose e a ativação da célula.

Esses PRRs possuem diferentes classes, havendo um interesse maior nos receptores semelhantes à toll (TLR, *Toll-like Receptor*) e uma família de lectinas do tipo-C (CLRs), os quais parecem ter papel central na imunidade antifúngica (Willment & Brown, 2008), levando à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (Means *et al.*, 2000; Underhill & Ozinsky, 2002; Roeder *et al.*, 2004). As lectinas do tipo C (*C-typelectin receptors*, CLRs) são uma grande família de moléculas ligadoras de carboidrato cálcio-dependentes expressas em macrófagos, células dendríticas e outros leucócitos (Willment & Brown, 2008). O receptor de manose (MR), os receptores Dectina-1 e Dectina-2 são exemplos de CLRs envolvidos na imunidade antifúngica, embora seus

papéis e mecanismos nela ainda estejam sendo esclarecidos (Willment & Brown, 2008; Drummond & Brown, 2013).

Os receptores dectina-1, membros do grupo V dos receptores de lectina do tipo - C, altamente conservados entre camundongos e humanos, foram identificados originalmente como moléculas específicas de células dendríticas (Drickamer, 1999; Ariizumi *et al.*, 2000; Zelensky & Gready, 2005; Saijo & Iwakura, 2011). Eles são codificados por genes localizados na região telomérica do cromossomo 6 de camundongo, e no cromossomo humano 12q, onde muitos genes lectinas do tipo C (*C-type lectin genes*) estão localizados e formam *clusters* (Saijo & Iwakura, 2011).

Esses receptores são proteínas transmembrânicas glicosiladas do tipo II com um domínio extracelular de reconhecimento de carboidrato único (CTLD – C-typelectin-likedomain) e possuem um domínio na sua porção citoplasmática ITAM-like (Immuno receptor tyrosine-based activation motifs), encontrado em muitos outros receptores, através do qual a dectina-1 pode induzir sinal intracelular resultando em uma variedade de respostas que compreendem a ativação da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao zimosan em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Brown & Gordon, 2001; Gantner *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2008).

Além disso, outra função bem caracterizada do receptor Dectina-1 em resposta ao zimosan é a produção de mediadores lipídicos (Suram *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2010), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-23, CCL2, CCL3 (Dennehy *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2009). Essa produção é controlada por várias vias de sinalização que têm extenso *cross-talk* com outras vias ativadas

por diferentes PRRs, sendo essencial para uma imunidade antifúngica eficaz (Netea *et al.* 2006). Demonstrou-se recentemente que a produção de IL-1 β , dependente de Syk, requer colaboração entre Dectina-1 e o inflamasoma NLRP3, que é ativado em resposta a β -glucanas (como curdlan). Embora os detalhes moleculares desta via ainda estejam sendo estudados, mostrou-se que a produção de ROS e um efluxo de potássio são necessários, e pode haver uma dependência parcial de TLR2 (Gross *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Lamkanfi *et al.*, 2009; Kankkunen *et al.*, 2010; Said-Sadier *et al.*, 2010). Também foi identificada a participação da dectina-1 na indução de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS 1), descritas como inibidores negativos de receptores de citocinas do tipo I e II, que modulam negativamente a sinalização de TLR e resposta de células T (Eberle & Dalpke, 2012).

A dectina-1 é um dos principais receptores de reconhecimento de β -glucanas, especialmente β -(1,3)-glucanas, podendo também reconhecer algumas outras moléculas como ligantes endógenos de células T e ligantes de mycobacteria (Marakalala *et al.*, 2010). As β -glucanas são polissacarídeos que podem estar presentes em algumas bactérias e plantas (Brown & Gordon, 2001), além de serem o principal componente da parede celular da maioria dos fungos sendo assim consideradas como os principais PAMPs envolvidos na interação fungo-hospedeiro (Tsoni & Brown, 2008; Bowman & Free, 2006).

Os mecanismos pelos quais a dectina-1 reconhece esses carboidratos ainda não estão esclarecidos, embora tenha sido demonstrado, que diferentemente dos outros CLRs, ela é uma ligadora de carboidrato cálcio-independente (Drummond & Brown, 2011). Recentemente, constatou-se que uma nova β -glucana particulada isolada de

Saccharomyces cerevisiae (Glyc 101) estimula dectina-1 e TLR2, induzindo a produção de TNF- α em macrófagos humanos e murinos, envolvendo a via clássica de sinalização tirosina quinase e ativação de NF- κ B (Roy *et al.*, 2011).

Através de sua especificidade para β -glucanas, o receptor Dectina-1 pode reconhecer uma variedade de espécies fúngicas incluindo o *Coccidioides* (Viriyakosol *et al.*, 2005), *Saccharomyces* (Brown *et al.*, 2003), *Aspergillus* (Hohl *et al.*, 2005; Steele *et al.* 2005; Gersuk *et al.*, 2006), *Pneumocystis* (Steele *et al.*; 2003), *Candida* (Brown *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2006; Gow *et al.*, 2007), *Cryptococcus neoformans* (Giles *et al.*, 2009) e *P. brasiliensis* (Bonfim *et al.*, 2009). A caracterização *in vitro* da interação desses organismos com células isoladas primárias e células transfectadas têm demonstrado que o receptor dectina-1 pode induzir uma série de respostas celulares protetoras contra fungos, tais como fagocitose e atividade fungicida, que são mediadas, pelo menos em parte, pela indução do burst respiratório (Gantner *et al.*, 2005; Steele *et al.*; 2003; Luther *et al.*, 2007). Essas interações também levam à indução de numerosas citocinas e quimiocinas, incluindo MIP-1 α , GM-CSF, G-CSF, TNF- α , MIP-2, IL-1 β , IL-1 α , IL-23, IL-10, IL-2 e IL-6 também em resposta aos fungos (Steele *et al.*; 2003; Brown *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2005; Steele *et al.*; 2005; Viriyakosol *et al.*, 2005; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007).

Na paracoccidiodomicose pouco se sabe sobre as funções do receptor dectina-1. Bonfim *et al.* (2009) observaram que após 30 minutos de desafio com *P. brasiliensis*, ocorre um aumento na expressão de RNAm para os receptores TLR2 e dectina-1 em resposta às células fúngicas, principalmente em resposta à cepa avirulenta Pb 265. Concluem que o reconhecimento do *P. brasiliensis*, internalização e consequente ativação da resposta imune contra o fungo é mediada por TLR2, TLR4 e dectina-1; e que o

reconhecimento preferencial de zimozan e Pb 265 seria realizado pelos receptores TLR2 e dectina-1, com indução de concentrações adequadas de IL-10, o controlaria a resposta inflamatória induzida por TNF- α e PGE₂, favorecendo uma resposta imune controlada benéfica para o hospedeiro.

Uma avaliação transcricional de células dendríticas murinas durante o período inicial de interação celular com *P. brasiliensis* revelou que 299 genes envolvidos na resposta imune, em transcrição, transdução de sinais e apoptose foram diferencialmente expressos. A análise gênica da expressão do receptor dectina-1 mostrou que o gene para o receptor foi significativamente induzido, sugerindo que o receptor participa do reconhecimento do *P. brasiliensis* (Tavares *et al.*, 2012).

No entanto, existem alguns trabalhos conflitantes, demonstrando que o bloqueio do receptor dectina-1 utilizando laminarina, que inibiria a ligação do *P. brasiliensis* ao receptor, não alterou a resposta de macrófagos murinos C57BL/6 *wild type* e de linhagem deficiente para MyD88, demonstrando que a produção de TNF- α em resposta ao *P. brasiliensis* não foi afetada com o bloqueio do receptor. Esse mesmo estudo utilizando linhagens deficientes para TLR2 e TLR4 também demonstrou níveis semelhantes de TNF- α em resposta ao fungo quando comparado a animais *wild type*, concluindo que MyD88, TLR2, TLR4 e dectina-1 não participam significativamente da indução de citocinas em resposta ao fungo (González *et al.*, 2008).

A análise da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas de camundongos susceptíveis (B10.A) foi significativamente inibida na presença de laminarina, enquanto que a fagocitose de *P. brasiliensis* por células dendríticas de camundongos resistentes (A/J) não foi alterada (Ferreira *et al.*, 2007). Também foi

observado que células dendríticas de camundongos resistentes produziam baixas concentrações de IL-10, IL-12 e TNF- α , enquanto células de animais susceptíveis apresentavam resultados inversos, com altos níveis de TNF- α e IL-10, sendo essa produção inibida na presença de laminarina, indicando a participação de TLR2 e dectina-1 na susceptibilidade ao fungo (Ferreira *et al.*, 2007).

Em trabalho recente demonstramos que a IL-18 não possui ação moduladora sobre a expressão do receptor dectina-1 na superfície de monócitos e induz aumento de TNF- α e IL-10 em monócitos não desafiados. Níveis mais elevados de IL-18 e IL-10 foram detectados após o desafio com a cepa virulenta (Pb 18), enquanto a cepa Pb 265 induziu uma maior expressão do receptor dectina-1 e maior produção de TNF- α por monócitos. No entanto, apenas os níveis de TNF- α induzidos pelas cepas foram diminuídos após bloqueio do receptor dectina-1, utilizando-se anticorpo monoclonal específico de bloqueio (Cestari *et al.*, 2013).

Assim, sabendo-se que na paracoccidiodomicose, uma resposta protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta do tipo Th₁, envolvendo como principais citocinas o IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Calich *et al.*, 1998; Arruda *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2002, Calvi *et al.*, 2003), e que a efetuação da resposta seria representada principalmente pelas células fagocitárias, os monócitos, macrófagos e neutrófilos, que para o desenvolvimento de uma atividade fungicida eficiente, necessitariam de sinais de ativação fornecidos por citocinas, particularmente o IFN- γ e TNF- α e GM-CSF (Soares *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2007), tornou-se extremamente interessante a avaliação do papel do receptor dectina-1 nesse contexto.

Dessa forma, como neutrófilos e monócitos possuem um envolvimento dinâmico na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, e sabendo-se da já elucidada importância da dectina-1 no reconhecimento fúngico e sua participação na imunidade antifúngica em outras infecções, entende-se que o estudo da interação do *P. brasiliensis* com o receptor dectina-1 da superfície de fagócitos humanos, nas condições já descritas anteriormente (Carmo *et al.*, 2002; Calvi *et al.*, 2003; Carmo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Bordon-Graciani *et al.*, 2012), e a avaliação da participação deste receptor na indução de produção de metabólitos de oxigênio e conseqüentemente na atividade fungicida destas células contra o *P. brasiliensis*, é de extrema importância para um melhor entendimento das vias de ativação disparadas durante o confronto fungo-fagócito.

3. Objetivos

Objetivo geral:

Avaliar o papel do receptor de β -glucanas dectina-1 sobre as funções fungicidas das células fagocíticas humanas contra o *Paracoccidioides brasiliensis*.

Objetivos específicos:

1) Avaliar a expressão da dectina-1 por monócitos e neutrófilos humanos ativados com TNF- α , IFN- γ e GM-CSF, e desafiados *in vitro* com *P. brasiliensis*.

2) Avaliar a participação da dectina-1 sobre a atividade de monócitos e neutrófilos humanos ativados com diferentes citocinas, e desafiados *in vitro* com *P. brasiliensis*, através da avaliação da recuperação fúngica e produção de peróxido de hidrogênio.

4. Casuística, Materiais e Métodos

4.1 Casuística

Foram avaliados monócitos e neutrófilos obtidos de 50 mL de sangue periférico de indivíduos voluntários saudáveis, que foram convidados a participarem da pesquisa, entre alunos do Curso de Ciências Biomédicas do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento.

4.2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Of. 526/2012).

4.3 Cultivo e teste de viabilidade do *P. brasiliensis*

Foi utilizada a cepa 265 (avirulenta) de *P. brasiliensis* (Pb265), mantida em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY (glicose 1,5 %, peptona 1 % e extrato de levedura 0,5 %) a 37°C, em tubos de 20 x 20 mm, por no mínimo 6 dias de cultivo.

Após o crescimento, as células fúngicas foram coletadas da superfície de cultivo através de alça de platina esterilizadas e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro com aproximadamente 10 mL de meio RPMI, e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Após isso, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, e uma alíquota (100µL de suspensão fúngica diluída em 900µL de meio RPMI) foi utilizada para contagem em câmara hemocitométrica

tipo Neubauer utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que se apresentaram com aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com a parede escura. Foram utilizadas as suspensões que apresentarem pelo menos 95% de viabilidade (Soares *et al.*, 2001). A concentração da suspensão fúngica utilizada nos ensaios foi de 2×10^4 fungos viáveis/mL nas macroculturas, estabelecendo-se uma relação fungo/monócito de 1:50.

4.4 Coletas de sangue periférico

As coletas de sangue foram realizadas por biomédicos disponíveis em nosso laboratório, nos dias agendados de acordo com o cronograma de desenvolvimento dos experimentos do projeto, utilizando o sistema BD-Vacutainer e tubos à vácuo heparinizados.

4.5 Isolamento e cultura de neutrófilos e monócitos do sangue periférico

Foram preparados tubos falcon de 15 mL contendo: 4,5 mL de histopaque 1119 e acima dele, 3mL de histopaque 1083 (todos da Sigma-Aldrich). Sobre esses dois diferentes gradientes de densidades foram colocados lentamente 8mL de sangue. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente (25°C), sem *break* e sem aceleração. Após a centrifugação, houve a formação de dois halos celulares: o halo superior composto de células mononucleares (MO) e o halo inferior composto pelos polimorfonucleares (PMN). Os halos superiores foram cuidadosamente coletados em tubos falcon de 50 mL e o conteúdo completado com aproximadamente 15 mL de meio RPMI. Após a coleta do primeiro halo, os segundos halos também foram coletados, acondicionados em outro tubo e nele adicionados também aproximadamente 15 mL de RPMI. Ambos os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm à 4°C.

Verificada a formação de *pellet* de células, foi descartado todo o sobrenadante. Aos PMNs foram acrescentados 3 ml de solução NaCl 0,2% gelada, para lise das hemácias, homogeneizado e acrescentados mais 3 ml de RPMI. Aos MOs foram acrescentados 6 mL de RPMI simples. Novamente os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores. Ao final das lavagens, os *pellets* celulares obtidos foram ressuspensos cada um em 1mL de MCCC (meio de cultura completo de células), contendo RPMI acrescido de 10% de soro bovino fetal. Em seguida os monócitos foram identificados e contados em câmara de Neubauer usando-se o corante vermelho neutro em diluição 1:10 e os neutrófilos usando-se corante azul de Trypan 1:10 (alíquotas de 50µL da suspensão celular foram diluídas em 450µL de corante). Foram utilizadas suspensões com viabilidade igual ou superior a 95%.

Para análise através de citometria de fluxo, as concentrações de MO foram acertadas para 1×10^6 células/mL, as de PMN para 2×10^6 células/mL e plaqueadas em placas de cultura de 48 wells, de acordo com o protocolo. Para avaliação da recuperação fúngica e produção de peróxido de hidrogênio, MO e PMN foram plaqueados em concentração 2×10^6 células/mL em placas de cultura de 96 wells de acordo com o protocolo.

As culturas de monócitos foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C / 5%CO₂ para a aderência das células.

4.6 Tratamento das culturas celulares:

Após o período de 2 horas para aderência, o sobrenadante das culturas de monócitos foi desprezado, e as culturas lavadas com meio RPMI-1640 para retirada das células não aderentes. Todo procedimento foi realizado com muito cuidado, para que não

ocorresse perda células da monocamada de monócitos. Assim, após lavagem, as culturas foram tratadas com: IFN- γ , na concentração de 250 U/mL; TNF- α , na concentração de 500 U/mL e GM-CSF, na concentração de 250 U/mL, de acordo com o mapa de tratamento. Todas as citocinas foram adquiridas da R&D System.

Quanto às culturas de neutrófilos, após isolamento, também foram tratadas com as citocinas nas mesmas doses e ordens aplicadas aos monócitos. Ambas as placas foram incubadas por 18 horas em estufa à 37°C com 5% CO₂.

Duas horas antes do início do desafio com o fungo, as células foram tratadas ou não com anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (Monoclonal Anti-Human Dectin-1/CLEC7A Antibody, R&D Systems), para bloqueio do receptor e consequente avaliação da participação individual da dectina-1 no reconhecimento do *P. brasiliensis*), de acordo com o mapa proposto.

4.7 Avaliação da expressão de dectina-1 da superfície de monócitos e neutrófilos por citometria de fluxo

Monócitos e neutrófilos isolados foram então incubados por 18 horas, na ausência ou na presença de IFN- γ (250 U/mL), TNF- α (500 U/mL) e GM-CSF (250 U/mL) seguido do desafio com a cepa avirulenta de *P. brasiliensis*, durante 4 horas. Para recuperação da monocamada de monócitos realizou-se lavagem dos Wells, após colocação das placas sobre o gelo, e assim retiramos os sobrenadantes das placas de monócitos e armazenados em tubos de citometria devidamente identificados. Em cada well adicionou-se 1mL de Isoton gelado e após 5 minutos em geladeira, lavou-se vigorosamente cada well, sempre coletando o sobrenadante e armazenando-os em seus respectivos tubos. Esse processo foi repetido mais uma vez.

Já das placas de neutrófilos, foram retirados os sobrenadantes e cada well foi lavado duas vezes com 1mL de Isoton e os sobrenadantes armazenados em tubos de citometria previamente identificados.

Todos os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1700 rpm. Após isso, verificou-se a formação de *pellet* de células, e retirou-se com cuidado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspenso passando os tubos rapidamente no vortex e foi iniciada a marcação com os anticorpos, tomando-se o cuidado de realizar a marcação com a luz do laboratório apagada. Os monócitos foram marcados com CD14⁺ conjugado com o fluorocromo FITC (BD Pharmingen) e Anti-dectina-1 conjugada com fluorocromo PE (AbDSerotec) , e um dos wells foi marcado com o controle negativo dos respectivos fluorocromos utilizados. Já os neutrófilos, foram marcados com CD16⁺ conjugado com fluorocromo PerCP (BioLegend) e também Anti-dectina, e um dos wells com os controles negativos dos fluorocromos.

Após as marcações, os tubos foram deixados por 20 minutos no escuro para incubação e foi adicionado o fixador. Eles foram guardados tampados, em geladeira, por no máximo 18 horas, para serem lidos pelo Citômetro de Fluxo modelo FACSCanto II com software FACSDiva, pertencente ao Laboratório Imunologia de Tumores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu. Os multiparâmetros celulares foram analisados no software FLOWJo. Foi padronizada a aquisição de 10.000 eventos por amostra e foi otimizada a população de interesse, população CD14⁺ (monócitos) e CD16⁺ (neutrófilos), estabelecendo-se *gate* (janela) com base em parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e fluorescência. A expressão

de fluorescência foi verificada por detectores específicos aos comprimentos de ondas emitido pelos fluorocromos utilizados.

4.8 Bloqueio da ligação do *P. brasiliensis* ao receptor dectina-1 utilizando-se anticorpo monoclonal

A avaliação da participação do receptor dectina-1 no reconhecimento do *P. brasiliensis* e consequente produção de H₂O₂ e recuperação fúngica de MO e PMN ativados ou não com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, foi realizada através da inibição seletiva da interação do *P. brasiliensis* com o receptor dectina-1, utilizando-se tratamento prévio destas células (2 horas antes do desafio com *P. brasiliensis*) com anticorpo monoclonal específico de bloqueio anti-dectina-1 (Monoclonal Anti-Human Dectin-1/CLEC7A Antibody, R&D Systems).

Ensaio de padronização foram realizados para identificação da melhor dose de anticorpo anti-dectina-1 para bloqueio do receptor, testando-se 3 diferentes doses do anticorpo (0.75, 1.5 e 3.0 μ g/mL).

4.9 Avaliação da recuperação de *P. brasiliensis* das culturas

Após tratamento das culturas conforme itens 4.6 e 4.8, as culturas foram desafiadas com Pb 265 por um período de 4 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados, e as monocamadas de monócitos e neutrófilos submetidas a diversas lavagens com água destilada estéril gelada. Este processo permitiu que as células fossem removidas da placa, lisadas, com consequente liberação dos fungos que foram, eventualmente, fagocitados. As suspensões obtidas através desse processo foram adicionadas aos sobrenadantes já

coletados e foram consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com as culturas controles, contendo apenas o fungo.

Ao final do processo, o material obtido, a partir das lavagens com água destilada, das culturas controles e das culturas experimentais resultou em um volume de 2 mL. Essas suspensões, contendo fungos viáveis ou não, foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 20 segundos, seguido de plaqueamento em duplicata de 100 µL das suspensões em placas contendo meio de cultura BHI – ágar (OXOID LTD., England), na concentração de 47g/L, acrescido de 4% de soro de cavalo, 50 µg/mL de gentamicina e 5% de extrato aquoso, preparado segundo o método de Kurita *et al.* a partir de filtrado de cultura de células leveduriformes do fungo (cepa 192), cultivadas em meio GPY a 37°C e com agitação (140 rpm) durante 7 dias.

A recuperação fúngica foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 10 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de recuperação fúngica} = \left[\frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controles}} \right] \times 100$$

4.10 Determinação da produção peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick & Keisari em 1980, e adaptado por Pick & Mizel em 1981.

Os sobrenadantes das culturas foram retirados e as células foram desafiadas com 0,1mL de suspensão de *P. brasiliensis* (Pb265), contendo 4x10⁴ fungos/mL diluídos em

solução vermelho fenol contendo 140mM de NaCl; 10mM de tampão fosfato pH 7; 5,5mM de dextrose; 0,56mM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA). Após 4 horas de desafio com *P. brasiliensis*, a reação foi interrompida pela adição de 0,01 ml de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620nm, contra um blank constituído de solução vermelho fenol e NaOH a 1N.

Os resultados da dosagem de H₂O₂ foram expressos em nanomols de H₂O₂/2x10⁵ células, a partir de uma curva-padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações nM conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho fenol. Em nossas condições experimentais as curvas foram realizadas com concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 e 8.0 nM de H₂O₂.

4.11 Análise estatística

A análise estatística, bem como a escolha dos testes de comparação das variáveis foram executados respeitando os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis de estudo.

Foram empregados os software SigmaStat 9.0 (Jandel Corporation) e GraphPad Prism 5.00 (GraphPad) e o nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%.

5. Resultados

5.1 Avaliação da ação do IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre a expressão de dectina-1 em monócitos e neutrófilos

5.1.1 Padronização da concentração ideal de anticorpos monoclonais para realização de ensaio de citometria

Visando identificar a ação de diferentes citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF na expressão do receptor dectina-1 em monócitos e neutrófilos humanos desafiados com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis*, iniciamos nossos estudos avaliando a expressão desse receptor nas diferentes coculturas.

Assim, antes do início dos experimentos realizamos ensaios para padronização das melhores doses dos anticorpos a serem utilizadas. Para avaliação da expressão de dectina-1, utilizamos 3 diferentes doses (10, 5 e 3 uL) de anticorpos anti-dectina-1, sendo identificado que a melhor dose para avaliação da expressão desse receptor, tanto em monócitos (fig. 1) como em neutrófilos (fig. 2), foi o volume de 10uL.

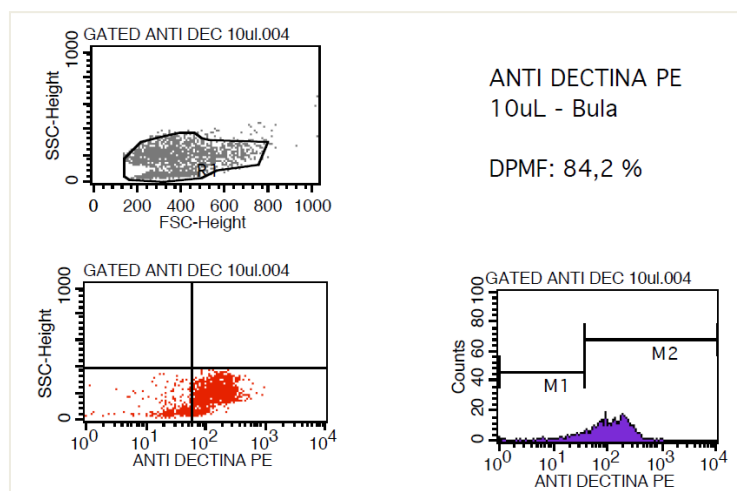


Fig. 1. Dot-plots e histograma representativos de um experimento de dois realizados, demonstrando a dose ideal de Anti-Dectina (PE) para marcação de monócitos.

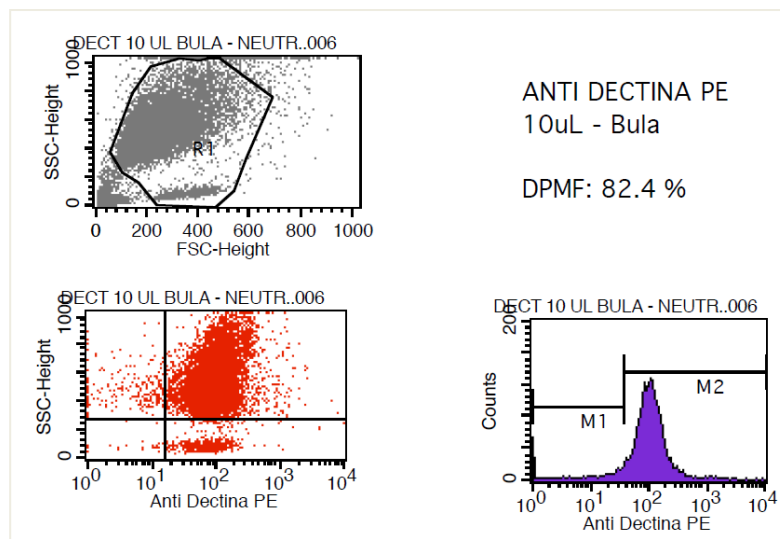


Fig. 2. Dot-plots e histograma representativos de um experimento de dois realizados, demonstrando a dose ideal de Anti-Dectina (PE) para marcação de neutrófilos.

Para avaliação da expressão do CD14 em monócitos, e CD16 em neutrófilos, também utilizamos 3 diferentes doses (20, 10 e 5 uL) de anticorpo anti-CD14, e 5 diferentes doses (5, 4, 3, 2.5 e 1.25 μ L) de anticorpo anti-CD16. Identificamos que as melhores doses para avaliação da expressão desses receptores, foi a de 10uL para anti-CD14 em monócitos (fig. 3), e de 3 uL para anti-CD16 em neutrófilos (fig. 4).

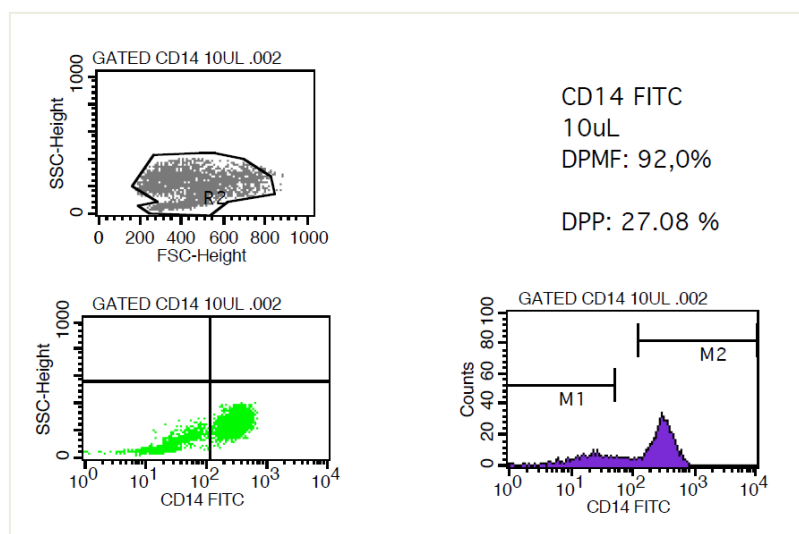


Fig. 3. Dot-plots e histograma representativos de um experimento de dois realizados, demonstrando a dose ideal de anti-CD14 (FITC) para marcação de monócitos.

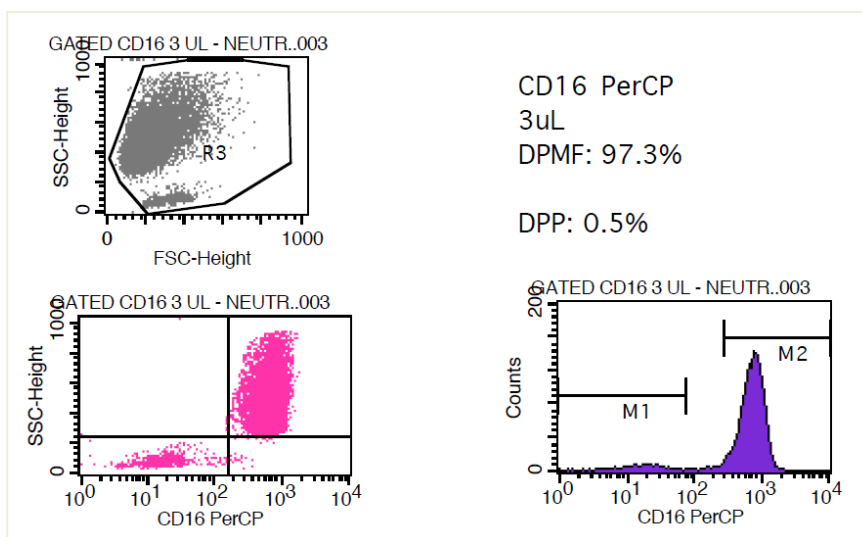


Fig. 4. Dot-plots e histograma representativos de um experimento de dois realizados, demonstrando a dose ideal de anti-CD16 (PerCP) para marcação de neutrófilos.

Esses ensaios foram analisados em Citômetro de Fluxo modelo FACSCalibur (BD), pertencente ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemonúcleo Regional de Jaú, Hospital Fundação Amaral Carvalho, na cidade de Jaú – SP.

5.1.2 Avaliação da ação do IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre a expressão do receptor dectina-1 em monócitos e neutrófilos

Realizada a análise de titulação das melhores doses de anticorpos a serem utilizadas, iniciamos os experimentos utilizando monócitos e neutrófilos de indivíduos normais, submetidos a diferentes tratamentos seguidos ou não do desafio com *P. brasiliensis*. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II, utilizando o software FACS Diva versão 6.1.3, no laboratório de Imunologia de Tumores do Depto. de Microbiologia e Imunologia do IBB, UNESP. As amostras foram analisadas no software Flow Jo versão X 10.0.6.

Para cada amostra foi construído um gate inicial baseado nos parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e dentro deste gate foi gerado novo gate de análise single cells (FSC-A x FSC-H), onde os doublets foram excluídos. Dentro do gate single cells de cada amostra, foi construído novo gate para monócitos (CD14+) ou para neutrófilos (CD16+), na dependência do ensaio, e dentro dos mesmos foram analisados as células positivas para receptor dectina-1.

Nossos resultados demonstram que monócitos CD14+ apresentaram aumento na expressão do receptor dectina-1 quando as células foram tratadas com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF. O desafio realizado com *P. brasiliensis* durante 4 horas, com ou sem pré-ativação dessas células com TNF- α e GM-CSF, também promoveram aumento na expressão do receptor. Esses dados foram comparados às células controles (fig. 5).

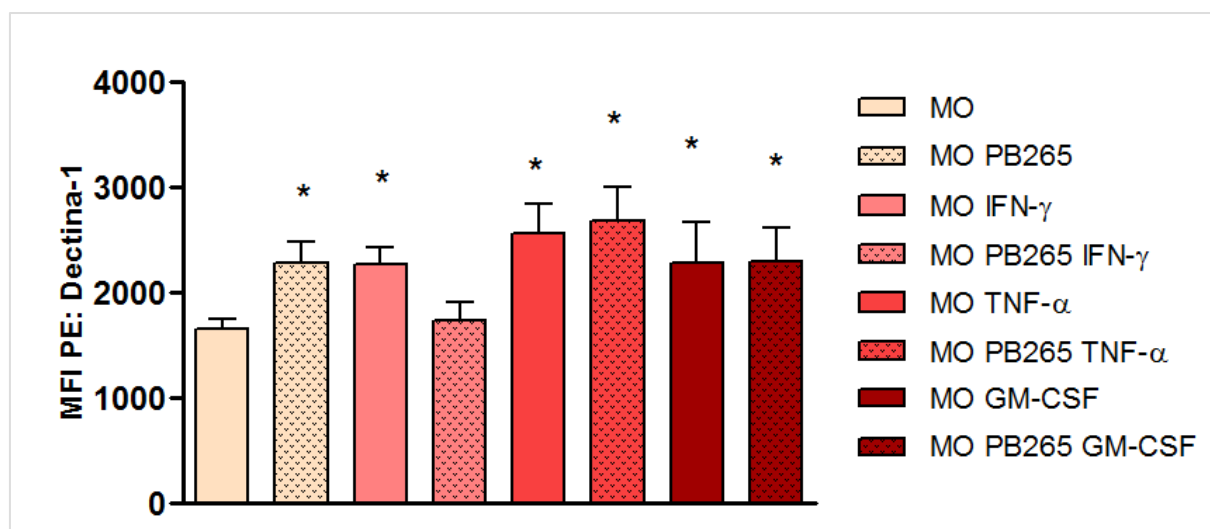


Fig. 5. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de monócitos (CD14+) tratados ou não com IFN- γ na concentração de 250 U/mL, TNF- α (500 U/mL) e GM-CSF (250 U/mL) durante 18 horas, seguido de desafio ou não com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis* por 4 horas. * $p < 0,05$ x MO (controle).

Ao avaliarmos as culturas de neutrófilos CD16+ que foram tratadas com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, seguido de desafio com *P. brasiliensis*, não identificamos diferenças

significativas entre os grupos (fig. 6). Notamos um pequeno aumento na expressão do receptor no grupo somente desafiado com *P. brasiliensis*, e no grupo tratado com TNF- α . No entanto, pudemos identificar que a média de intensidade de fluorescência (MIF) detectada nos ensaios foi bem maior nas culturas de monócitos CD14+ do que nas culturas de neutrófilos CD16+, demonstrando uma maior expressão desse receptor pelos monócitos, embora a porcentagem de células positivas para o receptor dectina-1 tenha sido semelhante em ambas as linhagens celulares (dados não mostrados).

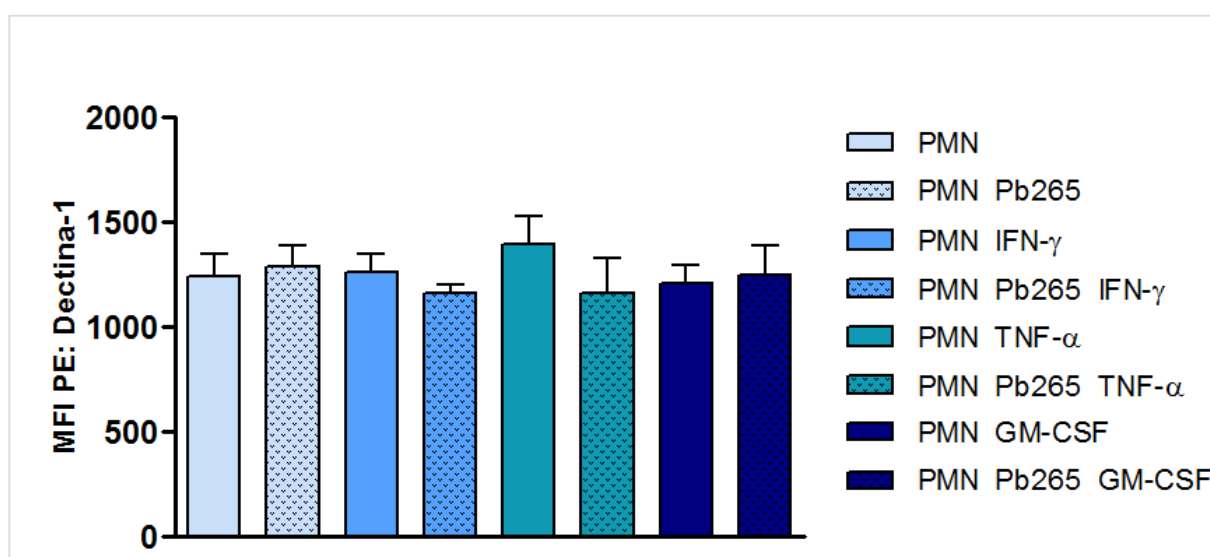


Fig. 6. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de neutrófilos (CD16+) tratados ou não com IFN- γ na concentração de 250 U/mL, TNF- α (500 U/mL) e GM-CSF (250 U/mL) durante 18 horas, seguido de desafio ou não com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis* por 4 horas.

5.2 Avaliação da ação do receptor dectina-1 sobre a recuperação fúngica e produção de peróxido de hidrogênio

5.2.1 Padronização da concentração ideal de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 para a determinação do bloqueio do receptor em monócitos e neutrófilos

Para avaliação da ação do receptor dectina-1 sobre a recuperação fúngica e produção de peróxido de hidrogênio, realizamos inicialmente, ensaios para a

padronização da melhor dose do anticorpo de bloqueio do receptor dectina-1 em monócitos. Para realização desses experimentos foram testados 3 indivíduos, utilizando as concentrações de 0.75, 1.5 e 3µg/mL de anticorpo anti-dectina-1. Observamos que a melhor dose de anticorpo para bloqueio foi detectada com a dose de 3µg/mL, tanto nas culturas de monócitos (fig. 7) quanto nas culturas de neutrófilos (fig. 8). Nessa concentração, atingimos a média de 53% e 46% de bloqueio de monócitos e neutrófilos, respectivamente, dose que passou a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Esses ensaios foram avaliados no laboratório de Imunologia de Tumores do Depto. de Microbiologia e Imunologia do IBB, UNESP.

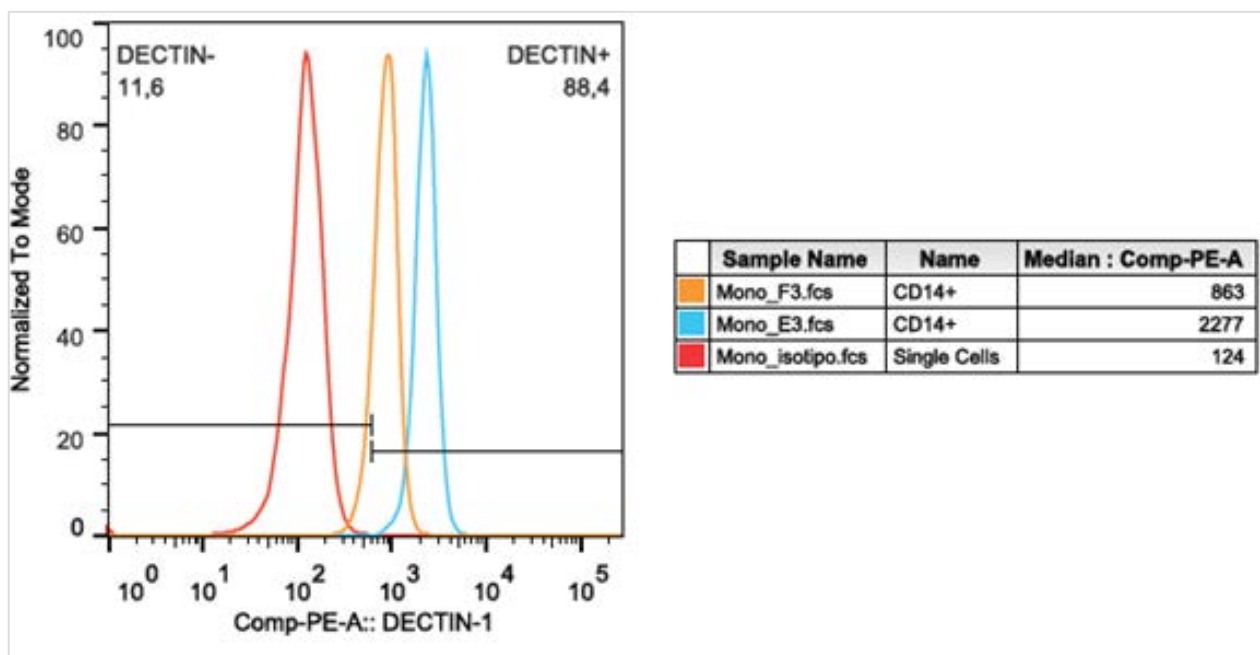


Fig. 7. Histograma de sobreposição de um experimento representativo da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) para receptor Dectina-1, de monócitos (linha azul) ou monócitos tratados com 3.0 µg/mL (linha laranja) de anticorpo monoclonal anti-dectina-1. A linha vermelha representa MIF do controle isotípico.

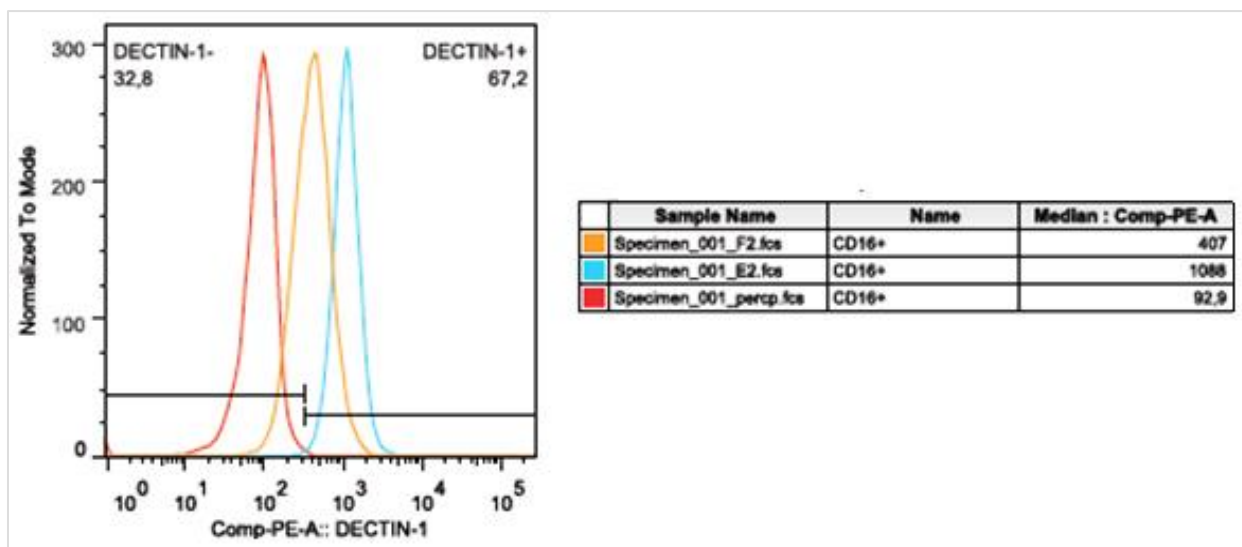


Fig. 8. Histograma de sobreposição de um experimento representativo da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) para receptor Dectina-1, de neutrófilos (linha azul) ou neutrófilos tratados com 3.0 µg/mL (linha laranja) de anticorpo monoclonal anti-dectina-1. A linha vermelha representa MIF do controle isotípico.

5.2.2 Avaliação da ação do receptor dectina-1 sobre a recuperação fúngica de monócitos e neutrófilos

Após análise da melhor dose de anticorpo anti-dectina-1 a ser utilizada nos ensaios de bloqueio do receptor para avaliação da participação do receptor sobre a recuperação fúngica das culturas, realizamos ensaios com monócitos e neutrófilos de indivíduos normais, tratados com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, seguido de tratamento com anticorpo de bloqueio anti-dectina-1 duas horas antes do desafio com *P. brasiliensis*, para avaliação do papel do receptor sobre a recuperação fúngica.

Na figura 9 (A, B e C) podemos visualizar nossos resultados que demonstram que todas as citocinas, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, foram capazes de diminuir a recuperação fúngica do *P. brasiliensis* em culturas de monócitos de indivíduos normais. O tratamento somente com anticorpo monoclonal de bloqueio anti-dectina-1 induziu um aumento na

recuperação fúngica nos grupos tratados, indicando a participação do receptor na indução de mecanismos efetores contra o *P. brasiliensis*.

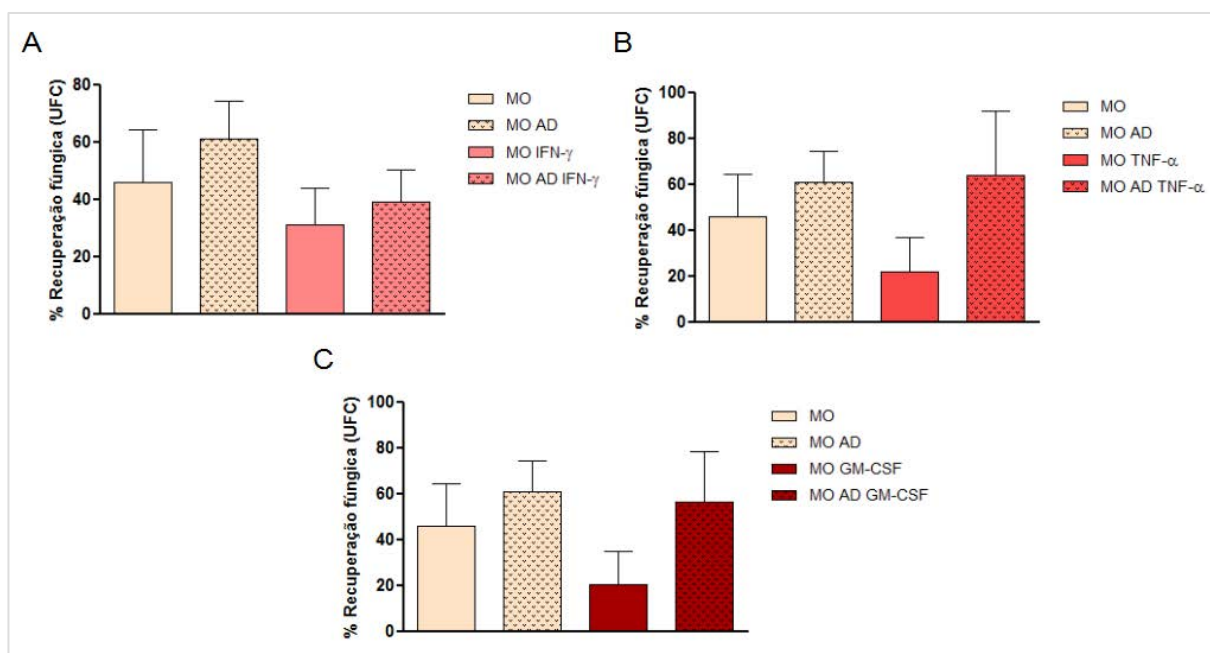


Fig. 9. Porcentagem da recuperação fúngica de monócitos (Mo) tratados ou não com (A) IFN- γ (250 U/mL), (B) TNF- α (500 U/mL) e (C) GM-CSF (250 U/mL) durante 18 horas, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (AD) (3 μ g/mL) e desafiados com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis* por 4 horas. * $p < 0,05$ x MO.

Ao analisarmos nossos dados referentes às culturas de neutrófilos (fig. 10), também identificamos resultados semelhantes às culturas de monócitos. O tratamento com as citocinas IFN- γ (fig. 10A), TNF- α (fig. 10B) e GM-CSF (fig. 10C) também foram capazes de diminuir a recuperação fúngica das coculturas. Além disso, o bloqueio do receptor dectina-1 com anticorpo monoclonal específico anti-dectina-1 induziu um aumento na recuperação fúngica dessas culturas (fig. 10), efeito esse também identificado nas culturas de monócitos.

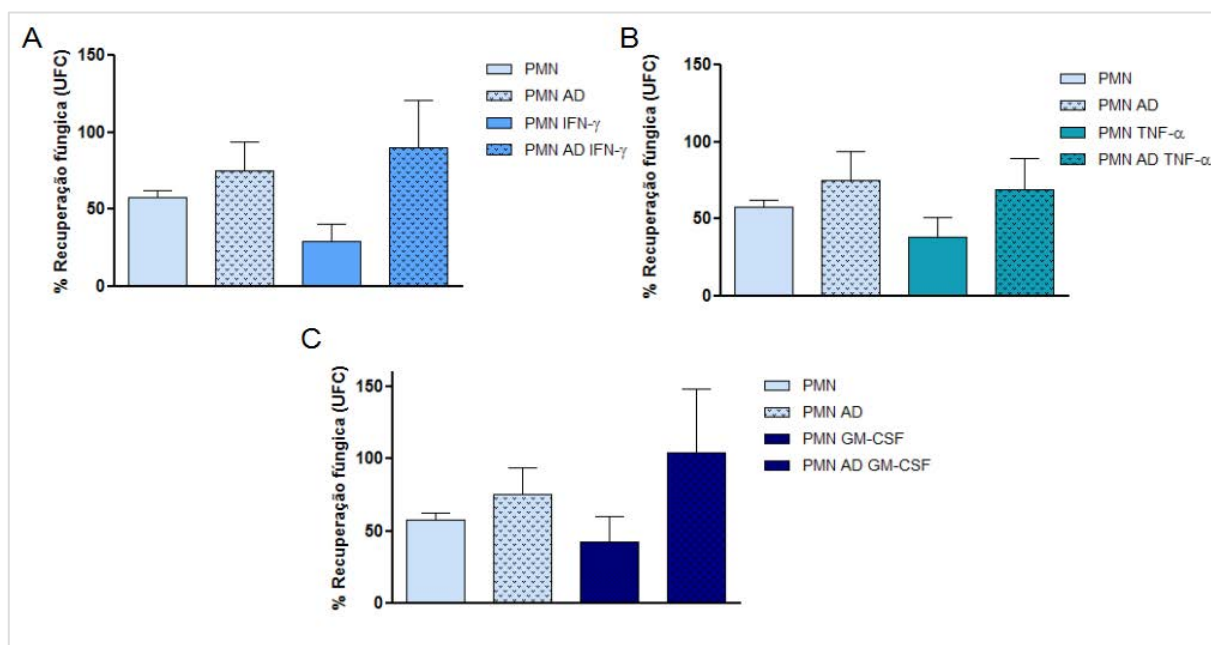


Fig. 10. Porcentagem da recuperação fúngica de neutrófilos (PMN) tratados ou não com (A) IFN- γ (250 U/mL), (B) TNF- α (500 U/mL) e (C) GM-CSF (250 U/mL) durante 18 horas, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (AD) (3 μ g/mL) e desafiados com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis* por 4 horas. * $p < 0,05$ x all.

5.3 Avaliação da ação do receptor dectina-1 sobre a produção de peróxido (H_2O_2) de hidrogênio de monócitos e neutrófilos

Na sequência dos experimentos, analisamos a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas culturas de monócitos e neutrófilos de indivíduos normais, tratados com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, seguido de tratamento com anticorpo monoclonal específico de bloqueio anti-dectina-1, duas horas antes do desafio com *P. brasiliensis*, para avaliação do papel do receptor sobre essa produção.

Nossos resultados demonstram que monócitos desafiados com a cepa avirulenta do *P. brasiliensis* (Pb 265) apresentaram aumento na produção de H_2O_2 . Nas culturas de monócitos tratados com IFN- γ (Fig. 11A), TNF- α (Fig. 11B) ou GM-CSF (Fig. 11C), e desafiadas ou não com *P. brasiliensis*, também identificamos aumento nos níveis desse

metabólito em relação às culturas controles. No entanto, essa produção foi diminuída quando as culturas foram tratadas com anticorpo monoclonal específico de bloqueio anti-dectina-1.

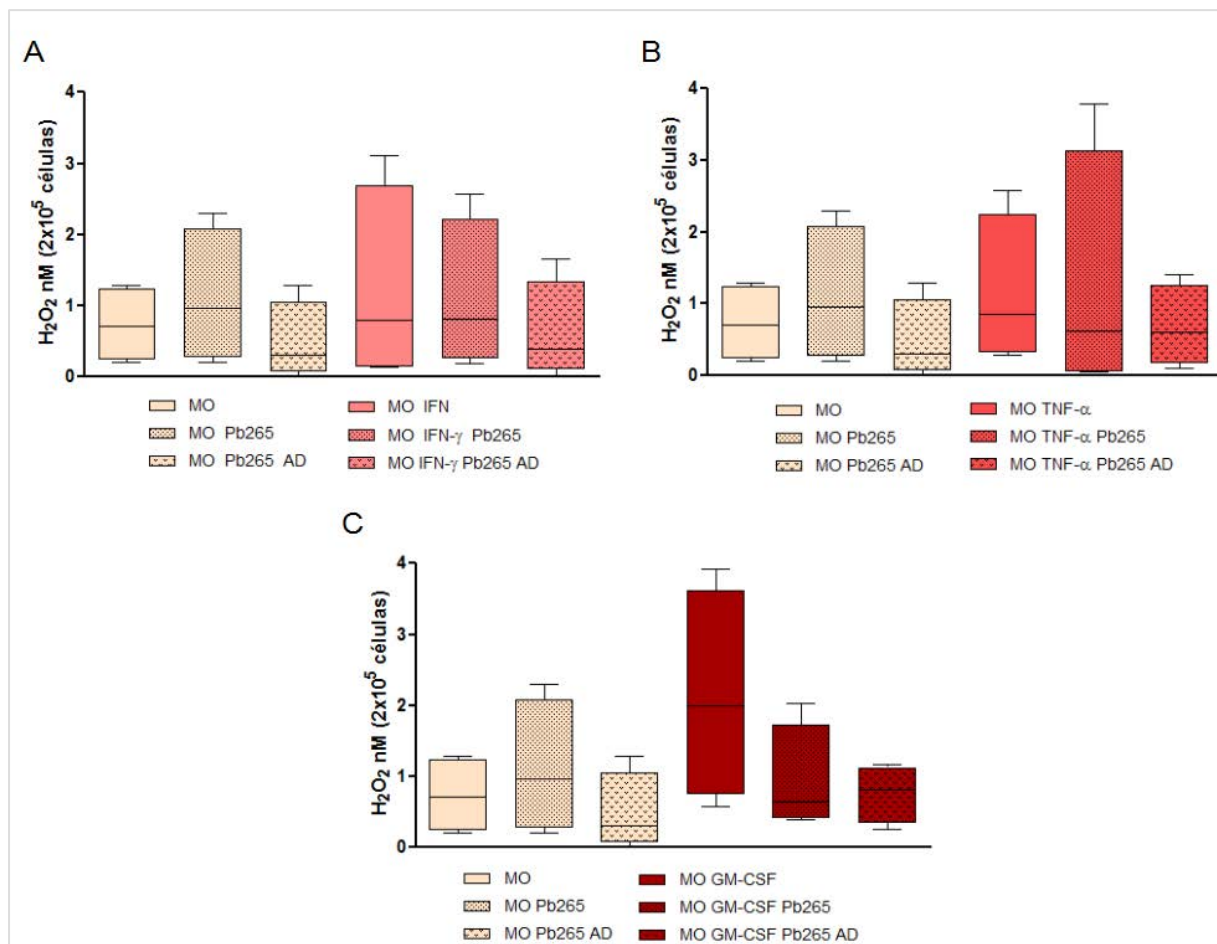


Fig. 11. Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) por monócitos (MO) tratados ou não com (A) IFN-γ (250 U/mL), (B) TNF-α (500 U/mL) e (C) GM-CSF (250 U/mL) durante 18 horas, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (AD) (3 μg/mL) e desafiados com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis* por 4 horas. *p<0,05 x all

Em relação às culturas de neutrófilos também identificamos resultados semelhantes às culturas de monócitos, quando neutrófilos somente desafiados com *P. brasiliensis* já apresentaram aumento na produção de H₂O₂, e quando tratados com IFN-γ (Fig. 12A), TNF-α (Fig. 12B) ou GM-CSF (Fig. 12C), e desafiadas ou não com *P. brasiliensis*,

também demonstraram aumento nos níveis desse metabólito em relação às culturas controles. Dado facilmente identificado é a capacidade de produção de H₂O₂ por neutrófilos, que se mostraram muito maiores do que os níveis produzidos por monócitos.

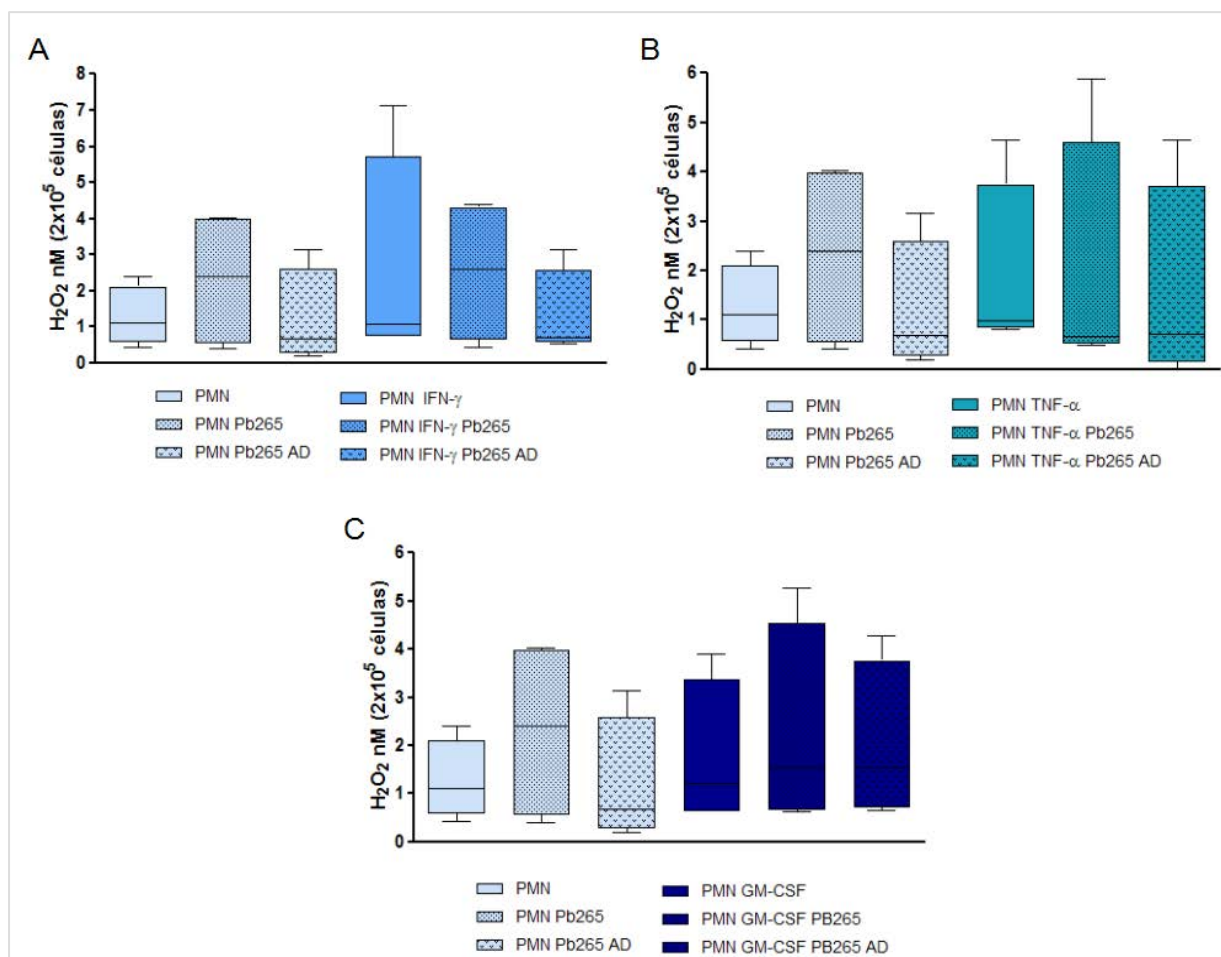


Fig. 12. Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) por monócitos (MO) tratados ou não com (A) IFN- γ (250 U/mL), (B) TNF- α (500 U/mL) e (C) GM-CSF (250 U/mL) durante 18 horas, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (AD) (3 μ g/mL) e desafiados com a cepa Pb265 de *P. brasiliensis* por 4 horas. *p<0,05 x all

6. Discussão

Desde que foi proposto que o sistema imune inato poderia reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através da interação com receptores expressos pelas células do hospedeiro, chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), muitas famílias de PRRs tem sido descritas e caracterizadas. Dentre as várias classes de receptores, encontra-se o receptor Dectina-1, que é altamente expresso na membrana de monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Brown & Gordon, 2001; Taylor *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2009), podendo também ser encontrado em subpopulações de células T (Brown & Gordon, 2003). Esses são os principais receptores de reconhecimento de β -glucanas, especialmente β -(1,3)-glucanas, principais componentes da parede celular da maioria dos fungos, que compreendem, na realidade, cerca de 60% do peso seco da parede celular fúngica, sendo assim consideradas como os principais PAMPs envolvidos na interação fungo-hospedeiro (Tsoni & Brown, 2008; Bowman & Free, 2006).

No entanto, embora seja bem aceito que o receptor Dectina-1 é um proeminente ativador da fagocitose, do *burst* respiratório (produção de ROS) em fagócitos, além da produção de mediadores inflamatórios (Brown & Gordon, 2001; Gantner *et al.*, 2003; Suran *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2008; Dennehy *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2010; Drummond & Brown, 2013) em camundongos, o papel desse receptor em fagócitos humanos ainda é incerto, uma vez que os estudos apresentam dados conflitantes (Kennedy *et al.*, 2007; van Bruggen *et al.*, 2009; Drummond & Brown, 2011).

Na paracoccidiodomicose pouco se sabe sobre as funções do receptor dectina-1. Os trabalhos que avaliaram a participação desse receptor utilizaram diferentes protocolos e os resultados indicam a participação do receptor no reconhecimento fúngico e na indução da produção de citocinas como TNF- α e outras citocinas (Bonfim et al., 2009; Tavares et al., 2012; Cestari et al., 2013). No entanto, também existem dados indicando a participação do receptor na susceptibilidade ao *P. brasiliensis* (Ferreira et al., 2007; González et al., 2008).

Assim, tornou-se extremamente interessante a avaliação do envolvimento desse receptor no disparo de mecanismos efetores de fagócitos humanos contra o *P. brasiliensis*. Dessa forma, os objetivos do presente estudo se justificam em função de resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa que demonstraram que monócitos e neutrófilos humanos desenvolvem atividade fungicida eficiente contra o *P. brasiliensis* somente após ativação com diferentes citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF (Carmo et al., 2002; Calvi et al., 2003; Carmo et al., 2006; Rodrigues et al., 2007; Bordon-Graciani et al., 2012). Essa atividade foi decorrente de uma maior produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), metabólito responsável pelo *killing* do *P. brasiliensis*, sendo que a cepa avirulenta (Pb 265) foi sempre capaz de induzir maior ativação da produção de H₂O₂ e da produção de citocinas como o TNF- α (Calvi et al., 2003; Carmo et al., 2006; Rodrigues et al., 2007; Bordon-Graciani et al., 2012).

Nossos resultados do presente estudo demonstraram que tanto a cepa avirulenta do *P. brasiliensis* (Pb 265), bem como os tratamentos com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF induziram aumento na expressão do receptor dectina-1 em monócitos. Esses tratamentos também promoveram diminuição na recuperação de fungos viáveis dessas culturas e

aumento na produção de H₂O₂, como já observado em estudos anteriores. No entanto, esse efeito foi revertido quando realizamos bloqueio da ligação do *P. brasiliensis* ao receptor, utilizando tratamento das culturas com anticorpo monoclonal específico de bloqueio anti-dectina-1, identificando diminuição na produção de H₂O₂ e aumento na recuperação fúngica nas culturas tratadas.

Assim, analisando resultados anteriores da literatura tentando correlacionar os vários resultados com a possível participação do receptor dectina-1, identificamos que Moscardi-Bacchi *et al.* (1994), utilizando monócitos e macrófagos humanos normais, verificaram que estas células permitem o crescimento e a multiplicação intracelular do *P. brasiliensis*. Essa ideia é reforçada por estudos que avaliaram a capacidade fungicida de macrófagos alveolares de pacientes. Nos indivíduos que apresentavam teste intradérmico positivo à paracoccidioidina, os macrófagos mostraram capacidade de degradar o fungo, enquanto que nos pacientes com paracoccidioidina negativa, essa atividade não foi detectada, indicando que nos pacientes com resposta imune celular adequada, os macrófagos estariam sendo ativados, passando a apresentar atividade contra o fungo (Goihmann-Yahr *et al.*, 1990).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a IL-18 possui uma ação importante sobre o aumento da expressão de TLR4 e receptor de manose (MR) em monócitos humanos (Dias-Melicio *et al.*, 2011a) e um papel modulador negativo sobre os mecanismos efetores contra o *P. brasiliensis*, uma vez que essa citocina foi capaz de promover condições favoráveis ao crescimento fúngico, sendo esse efeito relacionado com o reconhecimento do *P. brasiliensis* via MR, que dispararia mecanismos supressores de

resposta, causando aumento do crescimento do *P. brasiliensis* no interior das células (Dias-Melicio *et al.*, 2011b).

Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram que a pré-incubação de monócitos somente com IFN- γ não induz essas células a uma eficiente atividade fungicida contra cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb 18). Essa atividade contra a cepa virulenta é adquirida somente após pré-incubação com TNF- α , TNF- α mais IFN- γ , ou GM-CSF (Carmo *et al.*, 2002; Calvi *et al.*, 2003; Bordon-Graciani *et al.*, 2012). Quando as células são desafiadas com cepa de baixa virulência, a pré-ativação apenas com IFN- γ é suficiente para aquisição de uma eficiente atividade fungicida, demonstrando que na dependência da cepa utilizada, o processo de ativação das células fagocitárias pode necessitar de sinais dados por diferentes citocinas. Em relação aos mecanismos através dos quais os monócitos e macrófagos ativados exercem sua atividade contra o fungo, outros estudos do grupo demonstraram que a ação fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α envolve a geração de metabólitos do oxigênio como a H₂O₂ (Carmo *et al.*, 2006).

Em trabalho recente, avaliamos a participação da IL-18 sobre a expressão do receptor dectina-1 por monócitos humanos desafiados com *P. brasiliensis*, e identificamos que a IL-18 não possui ação moduladora sobre a expressão do receptor dectina-1. Observamos também que a cepa Pb 265 induziu uma maior expressão do receptor dectina-1 e maior produção de TNF- α por monócitos que foram diminuídos após bloqueio do receptor dectina-1, utilizando-se anticorpo monoclonal específico de bloqueio (Cestari *et al.*, 2013).

Calvi *et al.* (2003), estudando pacientes com paracoccidiodomicose, verificaram que a produção de TNF- α por monócitos infectados, *in vitro*, com a cepa de menor

virulência (Pb 265), era mais elevada em comparação à cepa virulenta (Pb 18). Além disso, níveis mais elevados dessa citocina apresentaram correlação com a maior atividade fungicida dos monócitos, demonstrando a importância do TNF- α nesse mecanismo. Da mesma forma, a incubação de monócitos humanos com IFN- γ mais fração de parede de *P. brasiliensis* rica em β -glucana, induziu essas células a uma maior produção de TNF- α com consequente aquisição de maior atividade fungicida (Dos Anjos *et al.*, 2002).

Segundo Figueiredo *et al.* (1993), tanto cepas de *P. brasiliensis* quanto frações da parede celular, ricas em β -glucanas são capazes de induzir níveis elevados de TNF- α , sendo possível sua detecção em soro de camundongos inoculados por via intraperitoneal com o fungo. As frações e a β -glucana purificada estimularam a secreção *in vitro* de TNF- α por macrófagos murinos, sugerindo que essa citocina é produzida em resposta ao *P. brasiliensis* e regulada por vários constituintes da parede celular do fungo.

Dessa forma, nossos resultados corroboram os dados anteriores e demonstram o envolvimento do receptor dectina-1 nas respostas já descritas contra o *P. brasiliensis*. Assim, na dependência da cepa e consequentemente do receptor inicialmente ativado, ou MR ou dectina-1, dentre outros, poderemos encontrar diferentes respostas que podem causar aumento ou diminuição da resistência contra o *P. brasiliensis*.

Em relação aos neutrófilos, obtivemos resultados semelhantes aos observados para monócitos. Os tratamentos com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF também promoveram diminuição na recuperação de fungos viáveis das culturas e aumento na produção de H₂O₂, níveis esses muito superiores aos produzidos pelos monócitos. Esse efeito também foi revertido quando bloqueamos a ligação do *P. brasiliensis* ao receptor, utilizando tratamento das culturas com anticorpo monoclonal específico de bloqueio anti-dectina-1,

identificando diminuição na produção de H₂O₂ e aumento na recuperação fúngica nas culturas tratadas.

A necessidade de um processo de ativação de neutrófilos para destruição de *P. brasiliensis* também têm sido detectada em alguns trabalhos. McEwen *et al.* (1987), demonstraram que neutrófilos de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* e estimulados com o fungo morto por via intraperitoneal, apresentaram maior atividade fungicida *in vitro*. No entanto, outros estudos mostraram que neutrófilos humanos não ativados apresentam atividade fungistática (Kurita *et al.*, 1999) e fungicida contra o *P. brasiliensis* (Kurita *et al.*, 2005). Esses efeitos antifúngicos foram significativamente aumentados após a ativação com IFN- γ , IL-1 e GM-CSF, sendo que as citocinas TNF- α e IL-8 não apresentaram efeito sobre essas atividades (Kurita *et al.*, 1999; Kurita *et al.*, 2000).

Nosso grupo, realizando trabalho semelhante com o objetivo de avaliar o efeito de citocinas como IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (Rodrigues *et al.*, 2007) e IL-15 (Tavian *et al.*, 2007) sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos desafiados *in vitro* com cepa de alta virulência do fungo, demonstrou que neutrófilos não ativados não desenvolvem atividade antifúngica. No entanto, uma significativa atividade fungicida é obtida após a incubação com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e IL-15. Adicionalmente, os resultados mostraram a participação do ânion superóxido e H₂O₂ como moléculas efetoras dos neutrófilos ativados contra o fungo.

No entanto, embora o bloqueio do receptor dectina-1 com anticorpo monoclonal específico de bloqueio tenha resultado em diminuição da produção de H₂O₂ e aumento da recuperação fúngica, os resultados do presente estudo não demonstraram diferenças na avaliação da expressão do receptor dectina-1 em neutrófilos, nas diferentes condições

experimentais, além de observarmos que a média de intensidade de fluorescência (MIF) dessas culturas foram muito menores do que as apresentadas pelas culturas de monócitos.

Esses resultados trazem novo conhecimento, demonstrando diferenças entre as linhagens celulares analisadas, indicando que a expressão do receptor dectina-1 em neutrófilos não sofre modulação pelas diferentes citocinas, além de apresentarem uma média de intensidade de fluorescência muito menor do que a observada em monócitos.

Podemos hipotetizar que como o receptor dectina-1 está envolvido na ativação da produção de metabólitos do oxigênio, e graças à grande capacidade dessas células em gerarem esses radicais, como observamos nos resultados referentes à produção de H_2O_2 , que foram muito maiores aos níveis produzidos por monócitos, a não modulação do receptor pelas diferentes citocinas poderia ser um controle celular de resposta de neutrófilos, que ao disponibilizar uma quantidade menor de receptores, não teria a ativação de uma resposta tão intensa, que provavelmente poderia ser deletéria ao hospedeiro.

Além disso, foi descrito recentemente outro mecanismo altamente sofisticado, que os neutrófilos lançam mão na destruição de patógenos, que é a formação de redes extracelulares (Neutrophil Extracellular Traps - NETs) compostas por proteínas derivadas do citoplasma celular e por DNA (Brinkmann *et al.*, 2004). O mais importante indutor de NETs, muitas vezes utilizado como controle positivo para liberação das redes extracelulares é o PMA, um ativador sintético da família de enzimas PKC, responsáveis diretas pela ativação de NADPH oxidase e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes produtos aparentam ser importantes na geração das NETs, uma vez que ROS

“scavengers” foram capazes de inibir a produção das NETs (Fuchs *et al.*, 2007; Raad *et al.*, 2009). Corroborando esses achados, também foi identificado que pacientes portadores de doença granulomatosa crônica, que não possuem NADPH oxidase funcional, também não foram capazes de gerar NETs, sendo esta capacidade restaurada após terapia gênica (Bianchi *et al.*, 2009).

As NETs possuem duas funções efetoras importantes na imunidade contra os mais diferentes patógenos. As redes extracelulares podem somente aprisionar o patógeno, impedindo a disseminação do mesmo, ou podem ainda ter uma ação microbicida direta sobre os microrganismos após aprisionamento. A possível atividade microbicida direta das NETs tem sido demonstrada para alguns microrganismos (Buchanan *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2006; Bianchi *et al.*, 2009; Pilsczek *et al.*, 2010).

Recentemente identificamos que o *P. brasiliensis* é capaz de induzir a formação dessas redes *in vitro* (Bachiega *et al.*, 2013a), além da identificação dessas estruturas em lesões tegumentares de pacientes com paracoccidiodomicose (Della Coletta *et al.*, 2013). Além disso, essas NETs induzidas pelo fungo apresentaram efeito fungicida contra o *P. brasiliensis* (Bachiega *et al.*, 2013a). Em trabalho mais recente identificamos que a geração das NETs em resposta ao *P. brasiliensis* foi mediado pelo receptor dectina-1, uma vez que ao bloquearmos o receptor com anticorpo monoclonal específico de bloqueio anti-dectina-1 antes do desafio com o fungo, observamos que a quantidade de DNA extracelular era significativamente diminuída, demonstrando então, diminuição na formação das NETs (Bachiega *et al.*, 2013b).

Assim, as citocinas IFN- γ , TNF- α , GM-CSF são capazes de induzir grandes quantidades de H₂O₂, que atuam de forma direta sobre o *killing* do *P. brasiliensis*, além de induzir a formação das NETs através de estímulo dado pela geração do metabólito. As

NETs formadas também apresentariam uma atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, como já demonstrado por Bachiega *et al.* (2013a).

No entanto, por se tratar de um mecanismo de morte celular denominado de NETose com formação de NETs, disparado com envolvimento do receptor dectina-1 (Bachiega *et al.*, 2013b), acreditamos mais uma vez em um controle celular de resposta de neutrófilos, que aconteceria através da contenção da expressão do receptor dectina-1, regulando todo o processo. Esses dados dão suporte à nossa hipótese, no entanto, até o momento, não existem dados de literatura que dêem respaldo à essa idéia.

Dessa forma, com o conhecimento gerado a partir desse estudo conseguimos propor que como a cepa de baixa virulência (Pb 265) apresenta grande quantidade de β -glucana na composição de suas paredes, quando comparada com a cepa virulenta (Pb 18), a indução de uma resposta inflamatória bastante intensa como já observada em estudos anteriores (Silva *et al.*, 1994; Carmo *et al.*, 2002; Calvi *et al.*, 2003; Carmo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Bordon-Graciani *et al.*, 2012), seria mediada através da ligação preferencial do fungo com receptores dectina-1 expressos nas membranas de fagócitos e dessa forma disparar os mecanismos efetores contra o fungo, como a H_2O_2 com consequente diminuição da recuperação fúngica.

7. Conclusão

A partir dos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir que:

O receptor dectina-1 está envolvido com a produção de H_2O_2 e consequente atividade fungicida de monócitos e neutrófilos ativados ou não com $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e GM-CSF.

8. Referências Bibliográficas

- AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* 2001; 2: 675-80.
- ALVAREZ Y, VALERA I, MUNICIO C, HUGO E, PADRÓN F, BLANCO L, RODRÍGUEZ M, FERNÁNDEZ N, CRESPO MS. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010. pii: 201929.
- ARIIZUMI K, SHEN GL, SHIKANO S, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J BiolChem.* 2000; 275:20157-20167.
- ARRUDA C, FRANCO MF, KASHINO SS, NASCIMENTO FR, FAZIOLI RDOS A, VAZ CA, RUSSO M, CALICH VL. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol.* 2002; 103:185-95.
- BACHIEGA TF, FERNANDES RK, RODRIGUES DR; BALDERRAMAS HA, DIAS-MELICIO LA, SOARES AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* induces neutrophil extracellular traps in vitro. *Frontiers in Immunology.* 2013a. v. 4. p. 502.
- BACHIEGA TF, FERNANDES, RK, RODRIGUES DR, XIMENES VF, DIAS-MELICIO LA, SOARES AMVC. Dectin-1 is involved in neutrophil extracellular traps (nets) release by human neutrophils in response to *paracoccidioides brasiliensis*. *Anais do 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology,* 2013b.

- BAUER S, HARTMANN G, GOODRIDGE HS, UNDERHILL DM. Fungal recognition by TLR2 and Dectin-1. In: Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Edited by Hofmanns F. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008:87-109.
- BIANCHI M, HAKKIM A, BRINKMANN V, SILER U, SEGER RA, ZYCHLINSKY A, REICHENBACH J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009. 114: 2619-22.
- BLOTTA MH, MAMONI RL, OLIVEIRA SJ, NOUÉR SA, PAPAORDANOU PM, GOVEIA A, CAMARGO ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Sep;61(3):390-4.
- BONFIM CV, MAMONI RL, SOUZA MH, BLOTTA L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2009; 17: 1-12.
- BORDON-GRACIANI AP, DIAS-MELICIO LA, ACORCI-VALÉRIO MJ, ARAUJO JP JR, DE CAMPOS SOARES AM. Inhibitory effect of PGE(2) on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Med Mycol*. 2012 May 2.
- BOWMAN SM, FREE SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 2006; 28:799-808.
- BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004. 303: 1532-5.

- BROWN GD, GORDON S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. *Nature Immunol.* 2001; 413: 36-37.
- BROWN GD, GORDON S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 2003; 19: 311-315.
- BROWN GD, HERRE J, WILLIAMS DL, et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucan. *J Exp Med.* 2003; 197: 1119-1124.
- BRUMMER E, HANSON LH, STEVENS DA. *In vitro* and *in vivo* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitides*. *J. Immunol.* 1988; 140: 2786-9.
- BRUMMER E, HANSON LH, RESTREPO A, STEVENS DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 1989; 57: 2289-94.
- BRUMMER E, CASTANEDA E, RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Apr;6(2):89-117.
- BUCHANAN JT, SIMPSON AJ, AZIZ RK, LIU GY, KRISTIAN SA, KOTB M, FERAMISCO J, NIZET V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006.16: 396-400.
- CALICH VLG, KASHINO SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 615-23.
- CALICH VLG, RUSSO M, VAZ CAC, BURGER E, SINGER-VERMES LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Ciênc Cult.* 1994; 46:455-61.

- CALVI SA, PERAÇOLI MTS, MENDES RP, MARCONDES-MACHADO J, FECCHIO D, MARQUES SA, SOARES AMVC. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003; 5: 107-13.
- CANO LE, BRUMMER E, STEVENS DA, RESTREPO A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect Immun.* 1992a; 60: 2096-100.
- CANO LE, ARANGO R, SALAZAR ME, BRUMMER E, STEVENS DA, RESTREPO A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol.* 1992b; 30: 161-8.
- CARMO JPM, PERAÇOLI MTS, CALVI SA, DIAS LA, TAVIAN EG, SOARES AMVC. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on human monocytes activation *in vitro* for high virulent *Paracoccidioides brasiliensis* killing. *Annual Review of Biomedical Sciences.* 2002; Special Issue: 94.
- CARMO JP, DIAS-MELICIO LA, CALVI SA, PERAÇOLI MT, SOARES AM. *TNF-alpha* activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006; 44: 363-8.
- CESTARI MB, BACHIEGA TF, FERNANDES RK, QUAGLIA E SILVA JC, GOLIM MA, SOARES AMVC, DIAS-MELICIO, LA. IL-18 does not modulate dectin-1 expression on human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Frontiers in Immunology* 2013. v. 4. p. 572.
- DELLA COLETTA AM, BACHIEGA TF, DE QUAGLIA E SILVA JC, MARQUES SA, MARQUES ME, DEFAVERI J, SOARES AMVC, DIAS-MELICIO LA. Identification of NETs (neutrophil

extracellular traps) in tegumentary lesions of patients with paracoccidioidomycosis Front. Immunol. 2013. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI).

DIAS-MELICIO LA, FERNANDES RK, GOLIM MA, RODRIGUES DR, SOARES AMVC. Treatment of human monocytes with Interleukin (IL)-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production. Inflammation Research. 2011a; 60: S110-S110.

DIAS-MELICIO LA, FERNANDES RK, GOLIM MA, RODRIGUES DR, SOARES AMVC. Interleukin (IL)-18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. Inflammation Research. 2011b; 60: S167-S168.

DENNEHY KM, WILLMENT JA, WILLIAMS DL, BROWN GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. Eur J Immunol. 2009, 39:1379-1386.

DOS ANJOS AR, CALVI SA, FERRACINI R, PERAÇOLI MTS, SILVA CL, SOARES AMVC. A role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. Med Mycol. 2002; 40: 377-82.

DRICKAMER K. C-type lectin-like domains. Curr Opin Struct Biol. 1999; 9: 585-590.

DRUMMOND RA, BROWN GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. Curr Opin Microbiol. 2011;14:392-399.

- DRUMMOND RA, BROWN GD. Signalling C-type Lectins in Antimicrobial Immunity. PLoS Pathog. 2013; 9(7); e1003417.
- DUNN PL, NORTH RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. Infect Immun. 1991; 59: 2892-2900.
- EBERLE ME, DALPKE AH. Dectin-1 stimulation induces suppressor of cytokine signaling 1, thereby modulating TLR signaling and T cell responses. J Immunol. 2012; 188: 5644-5654.
- FERREIRA KS, BASTOS KR, RUSSO M, ALMEIDA SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. The Journal of Infectious Diseases 2007; 196:1108–15.
- FIGUEIREDO F, ALVES LM, SILVA C L. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions. ClinExpImmunol. 1993; 93: 189-94.
- FRANCO M, MONTENEGRO MR, MENDES RP, MARQUES SA, DILLON NL, MOTA NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop. 1987 ; 20(2):129-32.
- FRANCO M, PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC, MONTENEGRO MR, MENDES RP, MEIRA DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol. 1993; 5:115-49.

- FUCHS TA, ABED U, GOOSMANN C, HURWITZ R, SCHULZE I, WAHN V, WEINRAUCH Y, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007. 176: 231-41.
- GANTNER BN, SIMMONS RM, CANAVERA SJ, AKIRA S, UNDERHILL DM. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 2003, 197:1107-1117.
- GANTNER BN, SIMMONS RM, UNDERHILL DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J.* 2005; 24: 1277-1286.
- GILES SS, DAGENAIS TRT, BOTTS MR, KELLER NP, HULL CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009, 77:3491-3500.
- GOIHMAN-YAHR M, ISTURIZ G, ROTTENBERG A. Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomicosis. *Interciência.* 1990; 200-5.
- GONZALES A, GREGORI W, VELEZ D, RESTREPO A, CANO LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000; 68: 2546-52.
- GONZÁLEZ A, YÁÑEZ A, GOZALBO D, GIL ML. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54(3):365-74.
- GOW NA, NETEA MG, MUNRO CA, FERWERDA G, BATES S, MORA-MONTES HM, WALKER L, JANSEN T, JACOBS L, TSONI V, BROWN GD, ODDS FC, VAN DER MEER JW, BROWN

- AJ, KULLBERG BJ. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis.* 2007;196: 1565-1571.
- GROSS O, POECK H, BSCHIEDER M, DOSTERT C, HANNESSCHLAGER N, ENDRES S, HARTMANN G, TARDIVEL A, SCHWEIGHOFFER E, TYBULEWICZ V et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature.* 2009, 459:433-436.
- HOHL TM, VAN EPPS HL, RIVERA A, et al. *Aspergillus fumigates* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoSPathog.* 2005; 1: e30.
- HUANG H, OSTROFF GR, LEE CK, WANG JP, SPECHT CA, LEVITZ SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists. *INFECT IMMUN.* 2009; 77 (5):1774-1781.
- KANKKUNEN P, TEIRILA L, RINTAHAKA J, ALENIOUS H, WOLFF H, MATIKAINEN S. (1,3)- β -Glucans activate both Dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol.* 2010, 184:6335-6342.
- KENNEDY AD, WILLMENT JA, DORWARD DW, WILLIAMS DL, BROWN GD, DELEO FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2007, 37:467-478.
- KOKKINOPOULOS I; JORDAN WJ, RITTER MA. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Molecular Immunol.* 2005; 42: 957-68.

- KUMAR H, KUMAGAI Y, TSUCHIDA T, KOENIG PA, SATOH T, GUO Z, JANG MH, SAITOH T, AKIRA S, KAWAI T. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal β -glucan. *J Immunol.* 2009, 183:8061-8067.
- KURITA N, OARADA M, ITO E, MIYAJI M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999; 37: 261-67.
- KURITA N, OARADA M, MIYAJI M, ITO E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000; 38: 177-82.
- KURITA N, OARADA M, BRUMMER E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol.* 2005; 43: 417-22.
- LAMKANFI M, MALIREDDI RKS, KANNEGANTI TD. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem.* 2009, 284:20574-20581.
- LEIBUNDGUT-LANDMANN S, GROSS O, ROBINSON MJ, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007; 8: 630-638.
- LEVITZ SM, NORTH EA. Gamma interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1996; 64: 1595-99.

- LUTHER K, TOROSANTUCCI A, BRAKHAGE AA, HEESEMANN J, EBEL F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 368-381.
- MARAKALALA MJ, GRAHAM LM, BROWN GD. The role of Syk/CARD9- coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin Dev Immunol.* 2010, 2010:567571.
- MEANS TK, GOLENBOCK DT, FENTON MJ. Structure and function of toll-like receptor proteins. *Life Sciences.* 2000; 68: 241-58.
- McEWEN JG, BRUMMER E, STEVENS DA, RESTREPO A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36: 603-8.
- MOSCARDI-BACCHI M, BRUMMER E, STEVENS DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol.* 1994; 40: 159-64.
- MUSATTI CC, PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC, REZKALLAH-IWASSO MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton. CRC Press. 1994. 175-86.
- NETEA MG, GOW NAR, MUNRO CA, BATES S, COLLINS C, FERWERDA G, HOBSON RP, BERTRAM G, HUGHES HB, JANSEN T et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006, 116:1642-1650.

- PERAÇOLI MTS, PARISE-FORTES M, PEREIRA DA SILVA MF, MONTENEGRO MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop.* 1995; 37:129-36.
- PILSCZEK FH, SALINA D, POON KK, FAHEY C, YIPP BG, SIBLEY CD, ROBBINS SM, GREEN FH, SURETTE MG, SUGAI M, BOWDEN MG, HUSSAIN M, ZHANG K, KUBES P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010. 185: 7413-25.
- RAAD, H, PACLET MH, BOUSSETTA T, KROVIARSKI Y, MOREL F, QUINN MT, GOUGEROT-POCIDALO MA, DANG PM, EL-BENNA J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J.* 2009. 23: 1011–1022.
- REID DM, GOW NAR, BROWN GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol.* 2009, 21:30-37.
- RESTREPO A, AND TOBÓN, AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.
- RODRIGUES DR, DIAS-MELICIO LA, CALVI AS, PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007; 45: 27-33.
- ROEDER A, KIRSCHNING CJ, RUPEC RA, SCHALLER M, WEINDL G, KORTING HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol.* 2004; 42: 485-98.

- ROGERS NC, SLACK EC, EDWARDS AD, et al. Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C-type lectins. *Immunity*. 2005; 22: 507-517.
- ROMANO CC, MENDES-GIANNINI MJS, DUARTE AJS, BENARD G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the *in vitro* antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine*. 2002; 18: 149-157.
- ROY S, DICKERSON R, KHANNA S, COLLARD E, GNYAWALI U, GORDILLO GM, SEN CK. Particulate β -glucan induces TNF- α production in wound macrophages via a redox sensitive NF- κ B-dependent pathway. *Wound Repair Regen*. 2011; 19: 411-419.
- SAID-SADIER N, PADILLA E, LANGSLEY G, OJCIUS DM. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One*. 2010, 5:10.
- SAIJO S, IWAKURA Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*. 2011; 23: 467-72.
- SHIKANAI-YASUDA MA, TELLES FILHO FDE Q, MENDES RP, COLOMBO AL, MORETTI ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 May-Jun; 39(3): 297-310.
- SILVA CL, ALVES LM, FIGUEIREDO F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology* 1994; 140 (Pt 5): 1189-94.

- SOARES AMVC, CALVI SA, PERAÇOLI MTS, FERNANDEZ AC, DIAS LA, ANJOS AR. Modulatory effect of prostaglandin on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol.* 2001; 102:480-5.
- STEELE C, MARRERO L, SWAIN S, et al. Alveolar macrophage mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 b-glucan receptor. *J Exp Med.* 2003; 198: 1677-1688.
- STEELE C, RAPAKA RR, METZ A, et al. The beta-glucan receptor Dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoSPathog.* 2005; 1: e42.
- SURAN S, BROWN GD, GHOSH M, GORDON S, LOPER R, TAYLOR PR, AKIRA S, UEMATSU S, WILLIAMS DL, LESLIE CC. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and Cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem.* 2006, 281:5506-5514.
- TAVARES AH, DERENGOWSKI LS, FERREIRA KS, SILVA SS, MACEDO C, BOCCA AL, PASSOS GA, ALMEIDA SR, SILVA-PEREIRA I. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Jan;6(1):e1459.
- TAVIAN EG, DIAS-MELICIO LA, ACORCI MJ, BORDON-GRACIANI AP, PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine.* 2007; 41: 48-53.
- TAYLOR PR, BROWN GD, REID DM, et al. The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002; 269: 3876-3882.

- TSONI SV, BROWN GD. Beta-glucans and dectin-1. NY AcadSci 2008;1143: 45–60.
- UNDERHILL DM; OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 825-52.
- URBAN CF, REICHARD U, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. Cell Microbiol. 2006. 8: 668-76.
- VAN BRUGGEN R, DREWNIAK A, JANSEN M, VAN HOUDT M, ROOS D, CHAPEL H, VERHOEVEN AJ, KUIJPERS TW. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. Mol Immunol. 2009, 47:575-581.
- VAUTIER S, MACCALLUM DM, BROWN GD. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. Cytokine. 2012; 58:89-99.
- VIRIYAKOSOL S, FIERER J, BROWN GD, KIRKLAND TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. Infect Immun. 2005; 73: 1553-1560.
- WILLMENT JA, BROWN GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity. Trends Microbiol. 2008; 16: 27-32.
- ZELENSKY AN, GREASY JE. The C-type lectin-like domain superfamily. Febs J. 2005; 272: 6179-6217.