



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

IVY RAFACHO VIEIRA

**Participação do TLR9 na atividade fungicida de células
dendríticas humanas desafiadas com o *Paracoccidioides
brasiliensis*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

**Botucatu
2017**

Ivy Rafacho Vieira

Participação do TLR9 na atividade fungicida de células
dendríticas humanas desafiadas com o
Paracoccidioides brasiliensis.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vieira, Ivy Rafacho.

Participação do TLR9 na atividade fungicida de células dendríticas humanas desafiadas com o *Paracoccidioides brasiliensis*. / Ivy Rafacho Vieira. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Capes: 40101096

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Células dendríticas.
3. Receptores Toll-like. 4. Resposta imune.

Palavras-chave: Células Dendríticas; Imunidade Inata;
Paracoccidioides brasiliensis; TLR9.

Estudo realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências,

UNESP - Botucatu.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Fatima Rafacho, a pessoa mais importante do meu mundo, quem sempre esteve comigo nas melhores e piores horas.

Confiou e acreditou em mim sempre, nunca mediu esforços.... E é por você que tenho forças para continuar lutando, pra seguir meus sonhos e alcançar meus objetivos....

Você é o meu maior exemplo de garra e determinação, minha guerreira.

Obrigada por tudo!

Te amo...

Agradecimentos Especiais

Agradeço à Deus, aos meus Orixás e Guias de Luz, que sempre se mostram presentes em minha caminhada.

*Mesmo que, por muitas vezes,
eu não mereça....*

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof^a. Dra. Ângela Maria Victório de Campos Soares, por me receber e me acolher nesta empreitada nada fácil, que é a vida acadêmica.

Agradeço pelos ensinamentos, dedicação,
carinho e paciência....

Agradeço ao meu grande amigo, de tantos anos, o doutorando Reginaldo Keller.... Régis.... Meu querido, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, por muitas vezes abdicar de suas coisas para me auxiliar.... Sem você nada disso teria sido possível!

Agradeço também à minha amiga, Dra. Daniela R. Rodrigues, Dáánnii, que me acolheu, me auxiliou, e acima de tudo, me deu sua amizade e tantos momentos felizes!

Agradeço à Profa. Dra. Alexandrina Sartori, que sempre me deu seu carinho, seus conselhos e orientações para diversos aspectos da minha vida, acadêmicos ou não.

Agradeço a minha irmã do coração, Talita Andrade (potcha sístér), que sempre se faz presente em minha vida, que ri comigo, chora comigo... em você eu sempre encontro o apoio de que preciso, a qualquer hora!

Agradeço a todos os meus amigos, principalmente os de Botucatu (não vou citar nomes), as meninas da República Tcheca... Todos que torceram e mandaram boas vibrações no decorrer desta caminhada e a tornaram mais leve.
Sem vocês, tudo teria sido muito mais difícil....

Agradecimentos

Agradeço aos doadores de sangue voluntários, pela imensurável contribuição ao doar uma parte de si para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos funcionários do IBB-UNESP Botucatu, pelo auxílio, convivência agradável e amizade nestes anos.

Agradeço à Profa Dra. Luciane Alarcão Dias Melício e ao Prof. Dr. Sílvio Luís de Oliveira, pelas valiosas contribuições na qualificação.

Agradeço ao laboratório de Citometria de Fluxo, sob supervisão do Prof. Dr. Ramon Kaneno, e principalmente à Carolina Mendonça Gorgulho (Carú) que muito me ajudou neste processo.

Agradeço aos funcionários da Seção de Pós-graduação, principalmente à Bruna Quirino Jorgeto, por sempre estar disposta à sanar minhas dúvidas prontamente.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Moléstias Infecciosas e Parasitárias (Doenças Tropicais).

A professora Dulce Helena Constantino, pelo auxílio e carinho, mesmo após o término da graduação.

A CAPES, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

"O sucesso tem muitos pais, mas o fracasso é órfão."

(John F. Kennedy)

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, causada pela inalação de propágulos micelianos do fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides spp.*(Pb). Dentre os mecanismos de resposta imune contra o fungo, destacam-se os exercidos pelas células fagocitárias como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs). Além do importante papel efetor, isto é, de destruição do fungo, essas células, por terem capacidade de produzir citocinas tanto pró como anti-inflamatórias, desempenham um importante papel modulador da resposta imune inata, assim como de instrução da resposta imune adaptativa que será gerada posteriormente. Para essa última função, as células dendríticas merecem destaque por constituírem a população de células fagocitárias mais adaptada ao processo de ligar, fagocitar, destruir, processar microrganismos e após migrarem aos órgãos linfóides periféricos, locais onde elas maturam para desenvolver o processo de apresentação de antígeno, desencadear e instruir a resposta imune adaptativa. No entanto, de forma similar às outras células fagocíticas, as DCs são capazes de liberar potentes moléculas citotóxicas que as capacita a destruírem eficientemente os microrganismos. Essa capacidade, embora necessária ao papel modulador das DCs citado acima, representa um mecanismo efetor importante durante a resposta imune inata. A maior ou menor capacidade das DCs destruírem os vários microrganismos pode resultar em diferenças na disseminação dos mesmos durante a migração dessas células da periferia até os órgãos linfóides secundários. Neste contexto, em estudo anterior avaliamos se DCs humanas exercem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* e se esse processo envolve a ativação do sistema NADPHoxidase com consequente produção de H_2O_2 , o metabolito envolvido na destruição do *P. brasiliensis*. Detectamos que as DCs não liberam níveis adequados de H_2O_2 e consequentemente não desenvolvem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*. Em outro estudo observamos que a interação das DCs com o Pb não resulta em maturação eficiente dessas células. O tipo de receptor de reconhecimento padrão (PRR) ao qual o fungo se liga pode determinar o seu destino no interior das células fagocitárias. Estudos têm mostrado que enquanto alguns deles estão envolvidos na replicação dos microrganismos no interior das células fagocíticas, ao contrário, outros participam da destruição dos mesmos. Nesse sentido, estudos sugerem que a estimulação de TLR9 através do ligante agonista CpG-ODN culmina com ativação do metabolismo oxidativo e consequente destruição de patógenos. Corroborando com esses estudos, detectamos que a incubação de DCs humanas com um agonista do TLR9

induziu um aumento significativo na atividade fungicida dessas células contra o *P.brasiliensis*. No entanto, esse efeito não esteve associado a um aumento da produção de H_2O_2 .

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, endemic to Latin America, caused by the inhalation of mycelial propagules of the thermodynamorphic fungus of the genus *Paracoccidioides spp.* (Pb). Among the mechanisms of immune response against the fungus, we highlight those exerted by phagocytic cells such as macrophages, neutrophils and dendritic cells (DCs). In addition to their important effector role, that is, fungus destruction, these cells, due to the capacity to produce both pro and anti-inflammatory cytokines, play an important role in modulating the innate immune response, as well as instructing the adaptive immune response. For this latter function, DCs deserve special attention, as they are the phagocytic cells population more adapted to the process of binding, phagocytizing, destroying, processing microorganisms and after migrate to the peripheral lymphoid organs, where they mature and instruct the adaptive immune response. However, similarly to other phagocytic cells, DCs are able to release potent cytotoxic molecules that enable them to efficiently destroy microorganisms. This ability, although necessary to their modulatory role cited above, represents an important effector mechanism during the innate immune response. The higher or lower capacity of DCs to destroy the various microorganisms may result in differences in dissemination of the infection during the migration of these cells from the periphery to the secondary lymphoid organs. In this context, in a previous study we evaluated whether human DCs exert fungicidal activity against *P. brasiliensis* and whether this process involves the activation of the NADP oxidase system with consequent H₂O₂ production, the metabolite involved in the *P. brasiliensis* killing. We have detected that DCs do not release adequate levels of H₂O₂ and consequently do not exert fungicidal activity against *P. brasiliensis*. In another study, we observed that the interaction of DCs with Pb does not result in efficient maturation of these cells. The type of pattern recognition receptor (PRR) to which the fungus binds can determine its fate within the phagocytic cells. Studies have shown that while some

PRRs are associated to the replication of microorganisms within the phagocytic cells, other, on the contrary, are involved in the mechanisms of pathogens killing. In this sense, studies suggested that TLR9 stimulation by the agonist CpG-ODN culminates with oxidative metabolism activation and pathogens elimination. Accordingly, in our study we detected that human DCs incubation with a TLR9 agonist results in a significant increase of the fungicidal activity of these cells against *P.brasiliensis*. However, this effect was not associated with an increase in H₂O₂ production.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	18
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
Células fagocitárias e paracoccidioidomicose: papel na resposta imune inata e adaptativa	19
2. OBJETIVOS	29
3. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO II	48
1. ARTIGO CIENTÍFICO	49
Abstract	49
Introduction	50
Methods	51
Samples.....	51
Fungi.....	51
Generation of dendritic cells.....	51
Fungicidal activity.....	51
H ₂ O ₂ production.....	52
Statistical analysis.....	52
Results	53
Stimulation with agonist for TLR9 results in increase in fungicidal activity of human DCs against Pb18 and Pb265.....	53
Effect of incubation with the TLR9 receptor antagonist on DCs fungicidal activity	53
Increase in fungicidal activity was not associated to higher H ₂ O ₂ levels	54
Discussion.....	56

Acknowledgements	57
Disclosures of potential conflicts of interest.....	57
References.....	58
2. CONCLUSÃO.....	60
3. ANEXOS.....	61

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

Objetivos

Referências

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Células fagocitárias e paracoccidioidomicose: papel na resposta imune inata e adaptativa

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela cujo agente etiológico é o fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides*, compreendendo as espécies crípticas do *Paracoccidioides brasiliensis* S1, PS2, PS3 e *Paracoccidioides lutzii* (Brummer *et al.*, 1993, Matute *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2009).

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos provavelmente presentes no solo, na água e nas plantas, que penetram no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando um complexo primário pulmonar. Esse processo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção, identificada pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, e desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (Oliveira, 2002). Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com consequente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais, pela via linfo-hematogênica (Franco *et al.*, 1987). As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões, que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma aguda é habitualmente grave, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A forma crônica tem duração prolongada, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema (Franco *et al.*, 1987; Mendes, 1994; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O estabelecimento da paracoccidioidomicose-infecção ou paracoccidioidomicose-doença nas suas formas mais ou menos graves, depende principalmente das complexas interações parasita-hospedeiro, que podem resultar em uma resposta imune mais ou menos eficaz por parte deste último. Neste contexto, muitos estudos clínicos e experimentais realizados com o objetivo de caracterizar a resposta imune do hospedeiro infectado mostraram uma importante participação tanto da resposta imune inata como adaptativa (Benard, 2008; Calich *et al.*, 2008a).

Os mecanismos da resposta imune inata desempenham um importante papel no combate a fungos patogênicos. Dentre eles, destacam-se as células fagocitárias como neutrófilos,

monócitos, macrófagos e células dendríticas que participam tanto como efetoras diretas exercendo atividade fungicida/fungistática, como moduladoras da própria resposta inata e também da resposta adaptativa que será desenvolvida posteriormente (Andrade *et al.*, 2008; Brown, 2011).

No caso do *P. brasiliensis*, cuja infecção atinge primeiramente os pulmões, acredita-se que a resposta inicial seja mediada pelos macrófagos alveolares. Estudos têm mostrado que após serem inalados, os conídios do fungo são fagocitados por essas células e convertidos em leveduras (McEwen *et al.*, 1987). Estas células podem fagocitar o *P. brasiliensis* através de receptores opsônicos e não opsônicos. Nesse sentido, estudos têm mostrado que o reconhecimento e fagocitose podem ocorrer através do receptor para complemento (CR3) presente nos macrófagos (Calich *et al.*, 1979) uma vez que o *P. brasiliensis* é capaz de ativar esse sistema pela via alternativa (Munk & Da Silva, 1992) ou pela via da lectina (Toledo *et al.*, 2010). O reconhecimento pode também ocorrer via receptores do tipo Toll (TLRs) (Bonfim *et al.*, 2009; Calich *et al.*, 2008b) ou ainda do tipo manose (Popi & Lopes, 2002). Após o processo de fagocitose, as atividades efetoras diretas dessas células, assim como as moduladoras, dependerão das complexas interações que serão estabelecidas entre o fungo e as outras células presentes no infiltrado inflamatório. Assim, vários estudos têm mostrado que as citocinas IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15 estão envolvidas na ativação de monócitos, macrófagos e neutrófilos murinos e humanos para que essas células exerçam atividade fungicida / fungistática eficiente contra o *P. brasiliensis* (Brummer *et al.*, 1988 e 1989; Cano *et al.*, 1992 a e b, Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1998; Kurita *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2000; Kurita *et al.*, 2000; Souto *et al.*, 2000; Calvi *et al.*, 2003 a e b; Kurita *et al.*, 2005, Carmo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008; Tavian *et al.*, 2008, Bannwart *et al.*, 2010). Adicionalmente, os estudos mostraram que o mecanismo através do qual essas citocinas aumentam essa atividade, envolve a ativação do metabolismo oxidativo com consequente produção de H₂O₂, e NO, os principais metabólitos envolvidos. Por outro lado, fatores que levam a inibição da atividade fungicida dessas células têm sido relatados, como a IL-10 que bloqueia a atividade fungicida de neutrófilos humanos e macrófagos murinos ativados com IFN- γ ou TNF- α (Costa *et al.*, 2007, Moreira *et al.*, 2010). Outras citocinas como a IL-6 e a IL-18, quando em contato com monócitos, além de não induzirem atividade fungicida, estimulam o crescimento do fungo no interior dessas células (Siqueira *et al.*, 2009; Dias-Melicio *et al.*, 2011). Estes estudos reforçam a ideia de que as células fagocitárias, de uma forma autócrina, conseguem modular as suas próprias atividades antifúngicas e provavelmente, as de outras células. De fato, estudos têm mostrado que monócitos liberam tanto citocinas pró como anti-inflamatórias em resposta

ao fungo (Kurokawa *et al.*, 2007). As células fagocitárias podem ainda modular as suas atividades atuando sobre outras células, que são fontes de importantes citocinas, como as NK, produtoras de IFN- γ . Na paracoccidiodomicose, estudos recentes mostraram que células NK podem participar ativamente da resposta contra o fungo, destruindo as leveduras através da liberação de granulicina, ou reconhecendo e destruindo células infectadas pelo fungo. Essa atividade pode ser aumentada pela incubação com IL-15. Além dessa atividade efetora direta, essas células podem ter um importante efeito modulador, uma vez que, são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α em resposta a IL-15 (Longhi *et al.*, 2012).

Os trabalhos acima deixam claro que uma modulação positiva ou negativa pelas células fagocitárias, dependerá do balanço entre a liberação de citocinas ativadoras como o TNF- α e o GM-CSF e IFN- γ e as desativadoras como a IL-10. Esse processo parece estar vinculado principalmente à cepa do fungo e a sua capacidade de induzir a liberação de um ou outro tipo de citocina (Calvi *et al.*, 2003a).

Adicionalmente, estudos têm mostrado de forma clara, que a eficiência das atividades das células fagocitárias dependerá do tipo de receptor de reconhecimento de padrão molecular (PRR) ao qual o fungo preferencialmente irá se ligar. Calich *et al* (2008 b), usando camundongos TLR4 deficientes e nocautes para TLR2, mostraram que tanto o TLR2 como o TLR4 estão envolvidos no reconhecimento do fungo. Esse reconhecimento resulta em um aumento da capacidade fagocítica com infecção de macrófagos e secreção de óxido nítrico (NO). No entanto, esse processo parece não levar a uma eficiente atividade macrofágica e diminuição significativa da carga fúngica, pois tanto animais normais quanto os deficientes apresentaram a mesma taxa de sobrevivência à infecção. Estudos em nosso laboratório, avaliando o papel dos receptores TLR2 e TLR4 na atividade de neutrófilos humanos desafiados com a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18), sugerem que a interação do fungo com os dois receptores pode ser considerada um mecanismo de patogenicidade, uma vez que esse fungo usa o TLR2 e principalmente o TLR4 para a sua entrada nas células e escapar das funções efetoras destas através da produção de IL-8 e IL-10 (Acorci-Valério *et al.*, 2010). Nakaira-Takahagi *et al* (2011), mostraram que tanto o fungo, como a gp43, seu principal antígeno, são capazes de modular a expressão de TLR2 e TLR4 e consequentemente a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por monócitos humanos. Além disso, foi mostrado que a fração gp43 se liga ao receptor de manose (MR) para inibir a capacidade fagocítica e fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e suscetíveis (Popi *et al.*, 2002). Esta descoberta levou os autores a

postular que a secreção de gp43 é um dos mecanismos de escape apresentados pelo *P. brasiliensis* e que essa proteína exerce seus efeitos ligando-se ao MR.

Em relação à resposta imune adaptativa na Pbmicose, os primeiros estudos mostraram que a resistência relaciona-se à um padrão de resposta do tipo Th₁, enquanto que a suscetibilidade, ao contrário, envolve uma resposta de padrão Th₂. Nesse sentido, tanto pacientes como camundongos, apresentam produção aumentada de isotipos de imunoglobulinas vinculadas a um padrão Th₂ de resposta como IgG4, IgE, IgA, eosinofilia periférica e baixos níveis de IL-8, IgA, IgM, IgG1 e IgG2b específicos de padrão Th₁ (Calich *et al.*, 1985; Cano *et al.*, 1995; Baida *et al.*, 1999; Mamoni *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos sobre o padrão de citocinas caracterizaram que o grupo de indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção apresenta resposta imune associada ao padrão Th₁, com alta resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo, teste cutâneo de HT positivo, ausência de anticorpos e níveis indetectáveis de IL-4, IL-5 e IL-10, e aumentados de IFN- γ , enquanto pacientes com a forma juvenil, apresentaram depressão da resposta linfoproliferativa e maiores níveis de IL-4 e IL-5, citocinas representativas do padrão Th₂, quando comparados aos indivíduos somente infectados e também os que apresentam a forma crônica da doença (Oliveira *et al.*, 2002). Foi também observada nos pacientes a associação entre baixos níveis de IL-2 e IFN- γ e a depressão da resposta imune celular (Benard *et al.*, 2001), assim como altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-1 β (Mello *et al.*, 2002). Outros estudos ainda mostraram que indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção expressam altos e precoces níveis de RNAm para IFN- γ , TNF- α e CXCL-9 e CXCL-10 quando comparados aos indivíduos com as formas mais graves da infecção. As citocinas de padrão Th₂: IL-4, IL-10, IL-5 e TGF- β foram sempre maiores nas duas formas da doença em relação aos indivíduos do grupo paracoccidiodomicose-infecção (Mamoni & Blotta, 2005). Confirmando a indução preferencial de uma resposta Th₂, estudos mostraram que pacientes liberam baixas concentrações de IL-12 (Romano *et al.*, 2002), assim como expressam baixos níveis dos receptores para essa citocina (Romano *et al.*, 2005). Os trabalhos com animais de experimentação, mais uma vez reforçaram os achados humanos. Camundongos suscetíveis liberam um padrão de citocinas de padrão Th₂ e os resistentes um padrão Th₁ (Singer-Vermes *et al.*, 1994; de Almeida *et al.*, 1998; Calich & Kashino, 1998; Kashino *et al.*, 2000; Livonesi *et al.*, 2008). Outros trabalhos associaram novamente indivíduos paracoccidiodomicose-infecção ao perfil Th₁ de resposta, uma vez que estes possuem maiores números de células CD8 produtoras de IFN- γ e CD4 produtoras de IL-2 e TNF- α , assim como maior número de células

CD3 expressando CXCL-9, CXCL-10 e CXCR4, e um baixo número de monócitos expressando IL-10 (Mamoni & Blotta, 2006). No entanto, com a caracterização de outras subpopulações de linfócitos CD4, os estudos mostraram a participação de outros perfis de resposta além do Th₁ e Th₂. Nesse sentido, têm sido demonstrada a participação de células T com fenótipo regulador e associadas a imunossupressão e suscetibilidade à doença. Células com essa característica tem sido detectadas tanto em pacientes (Cavassini *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013), como em modelos experimentais da doença (Moreira *et al.*, 2008b; Noal *et al.*, 2016; Loures *et al.*, 2014; Tristão *et al.*, 2013; Felonato *et al.*, 2012 e Moreira *et al.*, 2008b).

Trabalhos mais recentes, no entanto, têm questionado o papel regulador dessas células como sendo vinculado somente a suscetibilidade à infecção. Segundo os estudos, as células T_{reg} teriam um papel modulador sobre uma resposta efetora exacerbada, que poderia levar a lesões teciduais associadas à uma maior suscetibilidade a infecção (Pina *et al.*, 2013; de Amorim *et al.*, 2012; Felonato *et al.*, 2010 e Loures *et al.*, 2010).

Em estudo recente, Bazan *et al.*, (2015) mostrou o duplo papel das células T_{regs} durante a evolução da paracoccidiodomicose pulmonar em camundongos, isto é, um papel deletério por diminuir a resposta imune efetora e a erradicação do fungo, mas também o seu papel protetor, suprimindo a inflamação tecidual exacerbada.

Além das T_{regs}, as células Th₁₇ têm sido avaliadas na paracoccidiodomicose, mas o seu papel ainda não está bem definido. Células expressando IL-17 têm sido observadas em lesões cutâneas e de mucosa de pacientes e estão sendo associadas à granulomas organizados e destruição fúngica, o que associa essas células aos mecanismos de proteção. (Pagliari *et al.*, 2011). Em modelo experimental foi mostrado que uma resposta imune Th₁₇ prevalente resulta em um controle do crescimento fúngico, mas ao mesmo tempo, induz lesão tecidual mediada por neutrófilos (Loures *et al.*, 2009; Loures *et al.*, 2010). Outros estudos mostraram que o receptor Dectina-1 está associado a mecanismos de proteção na doença, por estar envolvido na diferenciação de células Th₁₇ (Loures *et al.*, 2014). A partir de um estudo sobre a relação entre os diversos perfis de resposta de células CD4, incluindo as Th₁₇ e as diferentes formas clínicas da doença, (de Castro *et al.*, 2013) foi proposto um modelo para explicar as diversas associações. A resistência à infecção detectada em indivíduos assintomáticos (paracoccidiodomicose-infecção) é mediada pela predominância de uma resposta Th₁, cujas citocinas como o IFN- γ , são responsáveis pela ativação de macrófagos, processo que, semelhante ao que ocorre durante a resposta imune inata, é fundamentalmente importante para a resistência à infecção. O perfil de resposta associada à forma mais grave da doença (aguda/juvenil), envolve

a predominância de um padrão Th₂ com produção de IL-4 e IL-5 e Th₉ que produz IL-9 e IL-21. IL-4 e IL-9 são responsáveis pela indução da produção de anticorpos IgG4 e IgE e IL-5 pela ativação de eosinófilos. A IL-4 contribui para a desativação de macrófagos. Já a forma intermediária da doença (adulta/crônica) apresenta uma resposta mista mediada por predominância de Th₁₇ e Th₂₂, e também uma contribuição dos outros subtipos Th₁ /Th₂ /Th₉. Essa resposta mista contribui parcialmente para a resistência a infecção e, ao mesmo tempo, está envolvida na exacerbação da resposta mediada por Th₁₇ com consequente ativação de neutrófilos, lesão tecidual e desenvolvimento de fibrose, processo típico dessa forma clínica. Ainda nesse grupo, haveria uma participação das T_{regs} que, ao mesmo tempo em que teriam o papel de controlar essa resposta inflamatória exagerada, participaria do processo de inibição da ativação macrofágica.

Os trabalhos acima mostram que da mesma forma que ocorre na resposta imune inata, as células fagocitárias são as mais importantes células efetoras também da resposta imune adaptativa, com destaque para os macrófagos ativados.

Adicionalmente, a capacidade das células fagocitárias de produzirem citocinas tanto pro como anti-inflamatórias, permitem que as mesmas além de modular a resposta imune inata, instruem a resposta adaptativa. Assim, a fina regulação da resposta imune adaptativa aos diversos microrganismos, incluindo o Pb, envolvendo as diferentes subpopulações deve-se, em grande parte, à interação inicial entre o agente infeccioso e as células fagocitárias que atuam como uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, estabelecendo o tipo de resposta imune a ser desenvolvido. As células fagocitárias como macrófagos, monócitos e mesmo neutrófilos podem participar desse processo, mas as células dendríticas merecem destaque por constituírem a população celular mais adaptada ao processo de ligar, fagocitar, destruir e processar microrganismos e após migrar aos órgão linfóides periféricos, locais onde elas maturam para desenvolver o processo de apresentação de antígeno, desencadear e instruir a resposta imune adaptativa (Cella *et al.*, 1997; Steinman., 1991 , Banchereau & Steinman, 1998).

Esse processo é determinado pela ligação dos microorganismos a diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A ligação do microorganismo a um ou outro PRR influenciará sobremaneira as várias etapas de ativação das DCs e consequentemente, o direcionamento da resposta de células T. Nesse sentido, estudos têm mostrado que tanto os receptores do tipo Toll (TLRs), quanto os do tipo lectina, como o receptor de manose, o dectina-1,2 e o DC-SIGN, podem estar envolvidos no reconhecimento dos fungos pelas DCs, possibilitando o desenvolvimento de diferentes tipos de resposta (Ramirez-Ortiz & Means, 2012). No que se

refere ao Pb, recentemente foi demonstrado que após a infecção ocorrem alterações importantes nas DCs pulmonares, que incluem a expressão de receptores para quimiocinas e consequente migração dessas células para os linfonodos regionais. Adicionalmente, as DCs derivadas da medula óssea estimuladas com Pb migram para os linfonodos e ativam respostas CD4+ preferencialmente do tipo Th₂ (Silvana dos Santos *et al.*, 2011). Esses resultados corroboram com outros do mesmo grupo, mostrando que DCs de animais suscetíveis à infecção, apresentam uma baixa capacidade de induzir uma resposta do tipo Th₁ e que a interação das DCs com o fungo ou seu antígeno imunodominante, a gp43, leva a uma inibição das moléculas MHC de classe II, das propriedades de adesão dessas células e da produção de IL-12 e TNF- α (Ferreira *et al.*, 2001). Adicionalmente, em animais suscetíveis, o fungo promove a indução de DCs regulatórias produtoras de IL-10, através da ligação ao TLR2 e dectina-1 (Ferreira *et al.*, 2007). Por outro lado, um importante estudo objetivando avaliar o perfil transcricional de DCs de camundongos em resposta a infecção pelo fungo mostrou que os genes codificadores das citocinas IL-12 e TNF- α mostrando que o fungo induz uma potente resposta pró-inflamatória (Tavares *et al.*, 2012). Células dendríticas de animais suscetíveis à infecção apresentaram um fenótipo de DCs mielóides pró-inflamatórias com secreção de altos níveis de IL-12 e TNF- α mas, no entanto, ocasionaram anergia de células T efectoras. Por outro lado, em animais resistentes foram detectadas DCs de fenótipo misto, isto é, tanto mielóide como plasmocitóide, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, acompanhada de altos níveis de TGF- β produtoras de IFN- γ e IL-17, concomitante com indução acentuada de células T reguladoras. A injeção de DCs primadas com o peptídeo derivado da gp43 do *P.brasiliensis*, que induz uma resposta Th₁ conferindo proteção em camundongos, resultou em inibição das lesões pulmonares e da carga fúngica. Esse efeito foi mediado por um aumento de IFN- γ e IL-12, e redução de IL-10 e IL-4 (Magalhães *et al.*, 2012).

DCs ativadas via ligação do fungo em Dectina-1, TLR-4, e MR instruem uma resposta de perfil Th₁₇ e TC17 (Loures *et al.*, 2015). DCs derivadas de monócitos de pacientes com doença ativa apresentam uma expressão diminuída de moléculas e HLA-DR, CD86 e DC-SIGN e da produção de IL-12 p40 em relação aos pacientes tratados, o que sugere uma disfunção dessas células durante a doença (Sato *et al.*, 2011).

Apesar dos trabalhos acima terem elucidado alguns aspectos da interação DCs/Pb, outros mecanismos decisivos na modulação desse processo merecem ser melhores investigados.

De forma similar às outras células fagocíticas, as DCs são capazes de liberar potentes moléculas citotóxicas que as capacita à destruírem eficientemente os microrganismos. Essa

capacidade, embora seja necessária ao papel modulador das DCs, particularmente para os mecanismos de processamento e apresentação de antígeno, representa um mecanismo efetor importante durante a resposta imune inata. A maior ou menor capacidade das DCs destruírem os vários microrganismos pode resultar em diferenças na disseminação dos mesmos durante a migração dessas células da periferia até os órgãos linfóides secundários (Aline *et al*, 2002, Rescigno *et al*, 2002, Serbina *et al*, 2003).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa avaliou se DCs humanas exercem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* e se esse processo envolve a ativação do sistema NADPoxidase com consequente produção de H_2O_2 , o metabolito envolvido na destruição do *P. brasiliensis*. Detectamos que as DCs não liberam níveis adequados de H_2O_2 e consequentemente, não desenvolvem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*. Ao contrário, permitem a sobrevivência do fungo no seu interior, principalmente quando desafiadas com o Pb18. Essa atividade não foi detectada mesmo após o processo de ativação, uma vez que houve apenas uma diminuição da sobrevivência do fungo, quando as células foram pré-incubadas com IFN- γ , GM-CSF ou TNF- α (Arruda *et al*, 2014, dados ainda não publicados). Outros estudos também realizados em nosso laboratório mostraram que a interação DC/Pb não resulta em maturação dessas células, o que impede que estas consigam realizar o trabalho de apresentação do antígeno de forma satisfatória. Isso pôde ser observado devido à diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias, como a CD80, CD83, CD86 e também a HLA-DR, responsável pela apresentação do antígeno, juntamente com o aumento da expressão de CD1a, fenótipo característico de DCs imaturas (iDCs) (Fernandes *et al*, 2015).

Como citado para as outras células fagocíticas, estudos têm mostrado, que o tipo de PRR ao qual o fungo se liga pode determinar o seu destino no interior dessas células. Assim, uma primeira abordagem experimental para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na sobrevivência do *P. brasiliensis* dentro das DCs envolve a determinação de qual ou quais PRR(s) expressos pelas DCs, estariam envolvidos em tal mecanismo. Dentro do papel dos PRRS, estudos têm mostrado que enquanto para alguns deles tem sido atribuído o papel de induzirem a replicação de microrganismos no interior das células fagocíticas, ao contrário, outros participam justamente da inibição desse processo. Um trabalho interessante de Lahiri *et al*. (2010), mostrou que o crescimento de *Salmonella typhimurium* em DCs humanas foi inibido pela estimulação dessas células com CpG-DNA, um agonista do receptor TLR9. Este efeito inibitório foi mediado pela ativação do sistema NADPH-oxidase, aumento na produção de ROS (espécies reativas do oxigênio), cuja função de regular a apresentação de antígenos já está bem estabelecida na literatura. Foi observado então, que, após a estimulação por CpG

–ODN, as DCs apresentaram melhor capacidade de apresentação de antígenos, característica esta, intimamente ligada a esse aumento. Então, supomos que esta estimulação poderia levar à produção adequada de H_2O_2 e consequentemente, levar as DCs à exercerem atividade fungicida. Estudos sugerem que a estimulação de TLR9 através do ligante CpG-ODN pode alterar sua conformação e ativar essa cascata de sinalização, alteração esta que, provavelmente, é responsável pelo recrutamento de moléculas adaptadoras que ativam o receptor a fim de tentar eliminar o patógeno (Latz *et al.*, 2007).

Diferentemente de outros receptores do tipo Toll, o TLR9 está localizado na membrana intracelular, tal como o retículo endoplasmático e outras organelas intracelulares. A habilidade de reconhecimento deste receptor está intimamente ligada à sua co-localização com sequências de DNA que possuem repetições de dinucleotídeos CpG não-metilados no endossomo, isso ocorre na dependência da ativação de proteínas da família Src (src-Family Kinases) (Jong *et al.*, 2010). A sua localização intracelular também atua como proteção para evitar o reconhecimento de DNA próprio (Stadlbauer *et al.*, 2008).

Constituído de repetições ricas de leucina (LRRs), um domínio transmembrânico e um domínio de homologia ao receptor Toll/IL-1 denominado TIR (Toll/interleukin-1 receptor-like domain), este por sua vez, localizado no citosol. A estimulação de TLR9 por meio de seus ligantes (CpG- ODNs) conduz à ativação de diversos fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1) (Kumagai *et al.*, 2008).

A ativação do NF- κ B pode acontecer dependente ou independentemente da proteína MyD88 (fator 88 de diferenciação mielóide), sendo que, o único TLR que utiliza a via independente é o TLR9. Essa ativação acontece mediante a sinalização do receptor, que ativa NF- κ B por meio de TRIF (TIR- domain-containing adapter-inducing interferon- β) e TRAM (TRIF- related adaptor molecule), que são moléculas adaptadoras do domínio TIR (Doyle *et al.*, 2006; O'Neill & Bowie, 2007).

Uma forma de DNA não metilada (CpG-DNA) é reconhecida pelo TLR9 dos endossomos das células dendríticas plasmocitóides (pDCs), as quais produzem IFNs do tipo I, visto que altos níveis de IFN estão associados à quebra da tolerância periférica e consequentemente lideram a resposta autoimune. A ativação do TLR9 pela administração de agonistas como o CpG-DNA ou oligodeoxinucleotídeo sintético CpG-ODN, induz forte ativação imune dos linfócitos Th1, ativação das células NK, células TCD8+, como forma de proteção intracelular ou eliminar a infecção crônica. Dessa forma, as pesquisas relacionadas aos TLR 9 têm surgido como uma ferramenta poderosa na geração da imunidade adaptativa Th1 (Arancibia *et al.*, 2007; Kumagai *et al.*, 2008; Krieg, 2007a). O tratamento com os ligantes forneceu proteção

temporária contra patógenos em diversos modelos experimentais e em humanos, pode suprimir infecções crônicas (HCV, por exemplo) e atuar como adjuvante potente de vacinas, induzindo resposta celular e humoral mais rapidamente (Krieg, 2007b).

O papel do TLR9 nas células apresentadoras de antígeno têm sido amplamente estudado, porém, este não constitui os únicos tipos celulares à expressarem este receptor (Kebir *et al.*, 2009). Células B e pDCs são os principais tipos celulares humanos que expressam este receptor constitutivamente e respondem diretamente à estimulação com CpG (Rothenfusser *et al.*, 2002). A ativação de TLR9 nestas células proporciona maturação, diferenciação e proliferação de células NK, T e monócitos/macrófagos que, em conjunto, secretam citocinas e quimiocinas, entre elas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-12 (Kinman, 2004). Alguns estudos sugerem ainda que este receptor tenha papel importante na proliferação e ativação de células T CD4⁺, e que também atue sobre células T_{regs}, modulando sua função supressora (Chiffoleau, 2007).

Os trabalhos citados mostram que a sobrevivência do fungo no interior das DCs pode resultar da ação de vários mecanismos de escape desse microrganismo da capacidade efetora dessas células, que podem ocorrer isoladamente ou estarem inter-relacionados. Assim, os estudos devem ser dirigidos no sentido de se explorar possíveis mecanismos que possam inibir ou reverter esse processo e também, avaliar as possíveis consequências dessa modulação para as funções das DCs. Nesse sentido, a estimulação dos receptores TLR9, que leva a uma ativação do sistema NADPoxidase e consequente aumento da produção de H₂O₂, o metabólito envolvido na morte do fungo, representa uma estratégia que merece ser investigada.

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar se o tratamento de células dendríticas humanas com um agonista do TLR9 resulta em aumento da atividade fungicida dessas células contra as cepas de alta e baixa virulência do *P.brasiliensis*.

2.2. Avaliar se esse possível efeito resulta da ativação do metabolismo oxidativo e consequente aumento na produção de H_2O_2 .

3. REFERÊNCIAS

ACORCI-VALÉRIO M.J.; BORDON-GRACIANI A.P.; DIAS-MELICIO L.A.; DE ASSIS GOLIM M.; NAKAIRA-TAKAHAGI E.; DE CAMPOS SOARES A.M. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J Immunol.** 2010; 71:99-108.

ADAMS O.; BESKEN K.; OBERDÖRFER C.; MACKENZIE C.R.; TAKIKAWA O.; DÄUBENER W. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. **J. Virol.** 2004; 78:2632-6.

ALINE F.; BOUT D.; DIMIER-POISSON I. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. **Infect Immun.** 2002; 70:2368-74.

ANDRADE RV, PAES HC, NICOLA AM, DE CARVALHO MJ, FACHIN AL, CARDOSO RS, SILVA SS, FERNANDES L, SILVA SP, DONADI EA, SAKAMOTO-HOJO ET, PASSOS GA, SOARES CM, BRÍGIDO MM, FELIPE MS. Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. **BMC Genomics.** 2006 14;7:208.

ARANCIBIA A.S.; BELTRÁN C.J.; AGUIRRE IM.; SILVA P.; PERALTA A.L.; MALINARICH F. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res.** 2007;40:97-112

BAIDA H, BISELLI PJ, JUVENALE M, DEL NEGRO GM, MENDES-GIANNINI MJ, DUARTE AJ, BENARD G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.** 1999;1:273-8.

BANCHEREAU J.; STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. 1998; 19; 392:245-52. Review.

BANNWART CF, MARTINS RA, NAKAIRA-TAKAHASHI E, DIAS-MELÍCIO LA, SOARES AM, PERAÇOLI MT. Interleukin-15 augments oxidative metabolism and fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2010;105:866-72.

BAZAN SB, COSTA TA, DE ARAÚJO EF, FERIOTTI C, LOURES FV, PRETEL FD, CALICH VL. Loss- and Gain-of-Function Approaches Indicate a Dual Role Exerted by Regulatory T Cells in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015; 29;9.

BENARD G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. 2008; 165:209-21. Review.

BENARD G, ROMANO CC, CACERE CR, JUVENALE M, MENDES-GIANNINI MJ, DUARTE AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**. 2001. 21;13:248-52.

BODAGHI B.; GOUREAU O.; ZIPETO D.; LAURENT L.; VIRELIZIER J.L.; MICHELSON S. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. **J. Immunol**. 1999; 162:957-64.

BONFIM CV, MAMONI RL, BLOTTA MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**. 2009; 47: 722-33.

BROWN G.D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu Rev Immunol.** 2011; 29:1-21.

BRUMMER E., CASTANEDA E., RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol.** 1993; Rev. 6:89-117.

BRUMMER E.; HANSON L.H.; RESTREPO A.; STEVENS D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun.** 1989; 57:2289-94.

BRUMMER E.; HANSON L.H.; STEVENS D.A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for no oxidative mechanisms. **Int J Immunopharmacol.** 1988; 10:945-52.

BUFAN B, MOJSILOVIC S, VUCICEVIC D, VUCEVIC D, VASILIJIC S, BALINT B, COLIC M. Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. **Int. Immunopharmacol.** 2009; 9: 910-7.

CALICH V.L.; DA COSTA T.A.; FELONATO M.; ARRUDA C.; BERNARDINO S.; LOURES F.V.; RIBEIRO L.R.; DE CÁSSIA VALENTE-FERREIRA R.; PINA A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia.** 2008a; 165: 223-36. Review.

CALICH V.L.; PINA A.; FELONATO M.; BERNARDINO S.; COSTA T.A.; LOURES F.V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2008b; 53:1-7.

CALICH VL & 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. Review.

CALICH VL, SINGER-VERMES LM, SIQUEIRA AM, BURGER E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol.** 1985; 66:585-94.

CALICH VL, KIPNIS TL, MARIANO M, NETO CF, DIAS DA SILVA WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. **Clin Immunol Immunopathol.** 1979; 12: 21-30.

CALVI S.A.; PERAÇOLI M.T.S.; MENDES R.P.; MARCONDES-MACHADO J.; FECCHIO D.; MARQUES S.A. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.** 2003a; 5:107-13.

CALVI S.A.; SOARES A.M.V.C.; PERAÇOLI M.T.; FRANCO M.; RUIZ R.L. JR.; MARCONDES-MACHADO J.; FECCHIO D.; MATTOS M.C.; MENDES R.P. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes Infect.** 2003b; 5:1373-9.

CANO L.E.; KASHINO S.S.; ARRUDA C.; ANDRÉ D.; XIDIEH C.F.; SINGER-VERMES L.M.; VAZ C.A.; BURGER E.; CALICH V.L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.** 1998; 66:800-6.

CANO L.E.; BRUMMER E.; STEVENS D.A.; RESTREPO A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. **Infect Immun.** 1992a; 60:2096-100.

CANO L.E.; ARANGO R.; SALAZAR M.E.; BRUMMER E.; STEVENS D.; RESTREPO A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J Med Vet Mycol.** 1992b; 30:161-8.

CARDOSO RM1, JHAM BC, DO CARMO GM, BATISTA AC, DE OLIVEIRA FA, DE PAULA EC, MESQUITA RA, DA SILVA TA, DUARTE EC. The relation between FoxP3⁺ regulatory T cells and fungal density in oral paracoccidioidomycosis: a preliminary study. **Mycoses.** 2014;57:771-4.

CARLIN J.M, BORDEN E.C.; SONDEL P.M.; BYRNE G.I. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. **J Leukoc. Biol.** 1989; 45:29-34.

CARMO J.P.; DIAS-MELICIO L.A.; CALVI S.A.; PERAÇOLI M.T.S.; SOARES A.M.V.C. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. **Med Mycol.** 2006; 44:363-8.

CAVASSINI KA, CAMPANELLI AP, MOREIRA AP, VANCIM JO, VITALI LH, MA-MEDE RC, MARTINEZ R, SILVA JS. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J Immunol.** 2006; 177: 5811-8;

CELLA M, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Origen, maturation and antigen presenting function of den-dritic cells. **Curr Opin Immunol** 9:10-6;

COSTA D.L.; DIAS-MELICIO L.A.; ACORCI M.J.; BORDON A.P.; TAVIAN E.G.; PERAÇOLI M.T.; SOARES A.M.V.C. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol Immunol.** 2007; 51:73-80.

DE ALMEIDA SR, DE MORAES JZ, DE CAMARGO ZP, GESZTESI JL, MARIANO M, LOPES JD. Antigen-presenting cells influence pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice. **Cell Immunol.** 1998; 25;190(1):68-76.

DE CASTRO LF, FERREIRA MC, DA SILVA RM, BLOTTA MH, LONGHI LN, MAMONI RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect.** 2013; 67:470-85.

DE LUCA A.; MONTAGNOLI C.; ZELANTE T.; BONIFAZI P.; BOZZA S.; MORETTI S.; D'ANGELO C.; VACCA C.; BOON L.; BISTONI F.; PUC CETTI P.; FALLARINO F.; ROMANI L. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-J dependent inhibition of Rorc. **Immunol.** 2007; 179:5999-6008.

DIAS-MELICIO L.A.; FERNANDES R.K.; GOLIM M.A.; RODRIGUES D.R.; SOARES A.M.V.C. Interleukin 18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. Inflammation Research. **Official Journal of The International Association of Inflammation Societies.** 2011; 60:S167.

DOYLE MB, ANDERSON CD, VACHHARAJANI N, LOWELL JA, SHENOY S, LISKER-MELMAN M, KORENBLAT K, CRIPPIN JS, CHAPMAN WC. Liver transplant for hepatitis C virus: effect of using older donor grafts on short- and medium-term survival. **Arch Surg.** 2008; 143:679-85; discussion 685.

FALLARINO F.; GROHMANN U.; YOU S.; MCGRATH B.C.; CAVENER D.R.; VACCA C.; ORABONA C.; BIANCHI R.; BELLADONNA M.L.; VOLPI C.; SANTAMARIA P.; FIORETTI M.C.; PUC CETTI P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J. Immunol.** 2006; 176:6752-61.

FELONATO M1, PINA A, DE ARAUJO EF, LOURES FV, BAZAN SB, FERIOTTI C, CALICH VL. Anti-CD25 treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One**. 2012;7:51071.

FELONATO M1, PINA A, BERNARDINO S, LOURES FV, DE ARAUJO EF, CALICH VL. CD28 exerts protective and detrimental effects in a pulmonary model of paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**. 2010;78:4922-35.

FERNANDES RK, BACHIEGA TF, RODRIGUES DR, GOLIM MDE A, DIAS-MELICIO LA, BALDERRAMAS HDE A, KANENO R, SOARES ÂM. Correction: *Paracoccidioides brasiliensis* Interferes on Dendritic Cells Maturation by Inhibiting PGE2 Production. **PLoS One**. 2015; 26;10:e0131380.

FERREIRA KS, MARANHÃO AQ, GARCIA MC, BRÍGIDO MM, SANTOS SS, LOPES JD, ALMEIDA SR. Dendritic Cells Transfected with scFv from Mab 7.B12 Mimicking Original Antigen gp43 Induces Protection against Experimental Paracoccidioidomycosis. **PlosOne** 2011; 7;6:15935.

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. **J Infect Dis**. 2007; 1;196:1108-15.

FERREIRA MC, DE OLIVEIRA RT, DA SILVA RM, BLOTTA MH, MAMONI RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**. 2001; 78: 4392-401.

FRANCO M.; MONTENEGRO M.R.; MENDES R.P.; MARQUES S.A.; DILLON N.L.; MOTA N.G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop.** 1987; 20:129-32.

GABRILOVICH D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. **Nat. Rev Immunol.** 2004; 4:941-52.

GROHMANN U.; FALLARINO F.; PUCCETTI P. Tolerance DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends Immunol.** 2003; 24:242-8.

GONZÁLES A.; GREGORI W.; VELEZ D.; RESTREPO A.; CANO L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun.** 2000; 68:2546-52.

GOWDA N.M, WU X., GOWDA D.C. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. **J Immunol.** 2012; 15;188:5073-85.

GUPTA S.L.; CARLIN J.M.; PYATI P.; DAI W.; PFEFFERKORN E.R.; MURPHY M.J. JR. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. **Infect Immun.** 1994; 62:2277-84.

HAYASHI T.; RAO S.P.; TAKABAYASHI K.; VAN UDEN J.H.; KORNBLUTH R.S.; BAIRD S.M.; TAYLOR M.W.; CARSON D.A.; CATANZARO A.; RAZ E. Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infect Immun.** 2001; 69:6156-64.

IWASAKI A.; MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol.** 2004;5:987-95.

KASHINO SS, FAZIOLI RA, CAFALLI-FAVATI C, MELONI-BRUNERI LH, VAZ CA, BURGER E, SINGER LM, CALICH VL. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res.** 2000; 20:89-97.

KRIEG A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. **J Clin Invest.** 2007(a);117:1184-94.

KRIEG A.M. Antiinfective Applications of Toll-like Receptor 9 Agonists. **Proc Am Thorac Soc.** 2007(b); 4: 289–294.

KUMAGAI Y, TAKEUCHI O, AKIRA S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. **Adv Drug Deliv Rev.** 2008; 29:60:795-804

KURITA N.; OARADA M.; BRUMMER E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med Mycol.** 2005; 43:417-22.

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.; ITO E.; MIYAJI M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** 1999; 37:261-67.

KURITA N, SANO A, COELHO KI, TAKEO K, NISHIMURA K, MIYAJI M. An improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol.** 1993;31:201-5.

KUROKAWA CS1, ARAUJO JP JR, SOARES AM, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol Immunol.** 2007;51:421-8.

LAHIRI A.; DAS P.; VANI J.; SHAILA M.S.; CHAKRAVORTTY D. TLR 9 activation in dendritic cells enhances *salmonella* killing and antigen presentation via involvement of the reactive oxygen species. **PLoS One.** 2010; 29;5:13772.

LATZ E, VERMA A, VISINTIN A, GONG M, SIROIS CM, KLEIN DC, MONKS BG, MCKNIGHT CJ, LAMPHIER MS, DUPREX WP, ESPEVIK T, GOLENBOCK DT. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. **Nat Immunol.** 2007;8:772-9.

LIVONESI MC, ROSSI MA, DE SOUTO JT, CAMPANELLI AP, DE SOUSA RL, MAFFEI CM, FERREIRA BR, MARTINEZ R, DA SILVA JS. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.** 2009; 11:123-32.

LONGHI LN, DA SILVA RM, FORNAZIM MC, SPAGO MC, DE OLIVEIRA RT, NOWILL AE, BLOTTA MH, MAMONI RL. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Immunol.** 2012; 15;189:935-45.

LOURES FV, ARAÚJO EF, FERIOTTI C, BAZAN SB, CALICH VL. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Front Microbiol.** 2015; 31;6:261.

LOURES FV, ARAÚJO EF, FERIOTTI C, BAZAN SB, COSTA TA, BROWN GD, CALICH VL. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+IL-17+ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis.** 2014; 1;210:762-73.

LOURES FV, PINA A, FELONATO M, ARAÚJO EF, LEITE KR, CALICH VL. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun.** 2010; 78:1078-88.

LOURES FV, PINA A, FELONATO M, ARAÚJO EF, LEITE KR, CALICH VL. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun.** 2010; 78:1078-88.

MACKENZIE C.R, HADDING U, DÄUBENER W. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. **J. Infect Dis.** 1998; 178:875-8.

MAGALHÃES A, FERREIRA KS, ALMEIDA SR, NOSANCHUK JD, TRAVASSOS LR, TABORDA CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Vaccine Immunol.** 2012; 19:23-9.

MAMONI RL, NOUÉR SA, OLIVEIRA SJ, MUSATTI CC, ROSSI CL, CAMARGO ZP, BLOTTA MH. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol.** 2002; 40:153-9.

MAMONI RL & BLOTTA MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine.** 2005; 7;32:20-9.

MAMONI RL & BLOTTA MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine.** 2006; 35:207-16.

MATUTE DR, MCEWEN JG, PUCCIA R, MONTES BA, SAN-BLAS G, BAGAGLI E, RAUSCHER JT, RE-STREPO A, MORAIS F, NINO-VEGA G, TAYLOR JW (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol** 23: 65-73.

MCEWEN JG, BEDOYA V, PATIÑO MM, SALAZAR ME, RESTREPO A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol.** 1987; 25: 165-75.

MENDES R.P. THE GAMUT OF CLINICAL MANIFESTATIONS. IN: FRANCO M.; LA-CAZ C.S.; RESTREPO-MORENO A.; DEL NEGRO G. (Eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton. **CRC Press.** 1994; p.233-58.

MENINO JF¹, SARAIVA M, GOMES-ALVES AG, LOBO-SILVA D, STURME M, GOMES-REZENDE J, SARAIVA AL, GOLDMAN GH, CUNHA C, CARVALHO A, ROMANI L, PEDROSA J, CASTRO AG, RODRIGUES F. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. **PLoS Negl Trop Dis.** 2013; 25;7:e2317.

MORAIS EA, CHAME DF, MELO EM, DE CARVALHO OLIVEIRA JA, DE PAULA AC, PEIXOTO AC, DA SILVA SANTOS L, GOMES DA, RUSSO RC, DE GOES AM. TLR 9 involvement in early protection induced by immunization with rPb27 against *Paracoccidioidomycosis*. **Microbes Infect.** 2016;18:137-47.

MOREIRA A.P.; DIAS-MELICIO L.A.; SOARES A.M.V.C. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. **Cell Immunol.** 2010; 263:196-203.

MOREIRA A.P.; DIAS-MELICIO L.A.; PERAÇOLI M.T.; CALVI S.A.; VICTORIANO DE CAMPOS SOARES A.M. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. **Mycopathologia.** 2008a; 166:17-23.

MOREIRA AP, CAVASSANI KA, MASSAFERA TRISTÃO FS, CAMPANELLI AP, MARTINEZ R, ROSSI MA, SILVA JS. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **J Immunol.** 2008b; 180: 3049-56.

MUNK ME & DA SILVA WD. Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. **J Med Vet Mycol.** 1992; 30: 481-4.

MUNN D.H.; SHARMA M.D.; MELLOR A.L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **J Immunol.** 2004a; 172:4100-10.

MUNN D.H.; SHARMA M.D.; HOU D.; BABAN B.; LEE J.R.; ANTONIA S.J.; MESSINA J.L.; CHANDLER P.; KONI P.A.; MELLOR A.L. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **J. Clin. Invest.** 2004b; 114:280-90.

MUNN D.H.; SHARMA M.D.; LEE J.R.; JHAVER K.G.; JOHNSON T.S.; KESKIN D.B.; MARSHALL B.; CHANDLER P.; ANTONIA S.J.; BURGESS R.; SLINGLUFF C.L. JR; MELLOR A.L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science.** 2002; 297:1867-70.

MUNN D.H.; SHAFIZADEH E.; ATTWOOD J.T.; BONDAREV I.; PASHINE A.; MELLOR A.L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J. Exp. Med.** 1999; 189:1363-72.

NAKAIRA-TAKAHAGI E.; GOLIM M.A.; BANNWART C.F.; PUCCIA R.; PERAÇOLI M.T. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 *from Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. **Med Mycol.** 2011; 49:694-703.

NOAL V, SANTOS S, FERREIRA KS, ALMEIDA SR. Infection with *Paracoccidioides brasiliensis* induces B-1 cell migration and activation of regulatory T cells. **Microbes Infect.** 2016; 11.

OLIVEIRA S.J.; MAMONI R.L.; MUSATTI C.C.; PAPAORDANOU P.M.; BLOTTA M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.** 2002; 4:139-44.

O'NEILL LA & BOWIE AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.** 2007;7:353-64.

PAGLIARI C, FERNANDES ER, STEGUN FW, DA SILVA WL, SEIXAS DUARTE MI, SOTTO MN. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microb Pathog.** 2011; 50:263-7.

PFEFFERKORN ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1984; 81:908-12.

PICK E.; KEISARI Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods.** 1980; 38:161-70.

PICK E.; MIZEL D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J Immunol Methods.** 1981; 46:211-26.

PINA A, DE ARAUJO EF, FELONATO M, LOURES FV, FERIOTTI C, BERNARDINO S, BARBUTO JA, CALICH VL. Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells. **Infect Immun.** 2013; 81:1064-77.

POPI A.F.; LOPES J.D.; MARIANO M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol.** 2002; 218:87-94.

RAMIREZ-ORTIZ Z.G.; MEANS T.K. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). **Virulence.** 2012; 3.

RESCIGNO M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. **Trends Microbiol.** 2002; 10:425-61. Review.

RODRIGUES D.R.; DIAS-MELICIO L.A.; CALVI S.A.; PERAÇOLI M.T.S.; SOARES A.M.V.C. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. **Med Mycol.** 2007; 45:27-33.

ROMANO CC, MENDES-GIANNINI MJ, DUARTE AJ, BENARD G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. **Clin Immunol.** 2005; 114:86-94.

ROMANO CC, MENDES-GIANNINI MJ, DUARTE AJ, BENARD G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine.** 2002; 7:18:149-57.

SATO PK, OSHIRO TM, DIOGO CL, PASSOS EC, SHIKANAI-YASUDA MA. Characterization of monocyte-derived dendritic cells from patients with active and treated paracoccidioidomycosis. **Scand J Immunol.** 2011; 74:609-18.

SCHMIDT S.K.; MÜLLER A.; HESELER K.; WOITE C.; SPEKKER K.; MACKENZIE C.R.; DÄUBENER W. Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. **Eur J Immunol.** 2009; 39:2755-64.

SERBINA NV, SALAZAR-MATHER TP, BIRON CA, KUZIEL WA, PAMER EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity.** 2003; 19:59-70.

SHIKANAI-YASUDA MA, TELLES FILHO FDE Q, MENDES RP, COLOMBO AL, MORETTI ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2006; 39:297-310.

SILVA AA, SOTTO MN, DUARTE MI, PAGLIARI C. Regulatory T cells in cutaneous lesions of patients with Paracoccidioidomycosis. **Microb Pathog.** 2013 ;65:36-40.

SILVANA DOS SANTOS S, FERREIRA KS, ALMEIDA SR. *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PLoS One.** 2011;6:19690.

SINGER-VERMES LM, BURGER E, CALICH VL, MODESTO-XAVIER LH, SAKAMOTO TN, SUGIZAKI MF, MEIRA DA, MENDES RP. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. **Clin Exp Immunol.** 1994; 97:113-9.

SIQUEIRA KZ; CAMPOS SOARES AM; DIAS-MELICIO LA; CALVI SA; PERAÇOLI MT. Interleukin-6 treatment enhances human monocyte permissiveness for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production. **Med Mycol.** 2009; 47:259-67.

SOARES A.M.; CALVI S.A.; PERAÇOLI, M.T.; FERNANDEZ A.C.; DIAS L.A.; DOS ANJOS A.R. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology.** 2001; 102:480-5.

SOUTO JT; FIGUEIREDO F; FURLANETTO A; PFEFFER K; ROSSI MA; SILVA JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol.** 2000; 156:1811-20.

STEINMAN RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.** 1991; 9:271-96. Review.

STONE TW; DARLINGTON LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nat. Rev. Drug Discov.** 2002; 1:609-20.

TAVARES AH, MAGALHÃES KG, ALMEIDA RD, CORREA R, BURGEL PH, BOCCA AL. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis.** 2013; 5;7:2595.

TAVIAN EG; DIAS-MELICIO LA; ACORCI M.J.; BORDON-GRACIANI AP; PERAÇOLI MTS; SOARES AMVC Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Cytokine.** 2007; 41(2008):48-53.

TEIXEIRA MM, THEODORO RC, DE CARVALHO MJ, FERNANDES L, PAES HC, HAHN RC, MENDOZA L, BAGAGLI E, SAN-BLAS G, FELIPE MS. (2009) Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52: 273-2834.

TERNESS P; BAUER TM; RÖSE L; DUFTER C; WATZLIK A; SIMON H; OPELZ G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **Exp. Med.** 2002; 196:447-57.

TOLEDO RG, DA SILVA WD, CALICH VL, KIPNIS TL. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Immunol.** 2010; 48:26-36.

TOROSANTUCCI A, ROMAGNOLI G, CHIANI P, STRINGARO A, CRATERI P, MARIOTTI S, TELONI R, ARANCIA G, CASSONE A, NISINI R. *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism dependent mechanism to escape the host's immune response. **Infect Immun.** 2004; 72: 833-43.

TRISTÃO FS, ROCHA FA, MOREIRA AP, CUNHA FQ, ROSSI MA, SILVA JS. 5-Lipoxygenase activity increases susceptibility to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect Immun.** 2013; 81:1256-66.

VON BUBNOFF D; MATZ H.; FRAHNERT C; RAO ML; HANAU D; DE LA SALLE H; BIEBER T. FcεRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. **J. Immunol.** 2002; 169:1810-6.

ZELANTE T; FALLARINO F; BISTONI F; PUCCETTI P; ROMANI L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. **Microbes Infect.** 2009; 11:133-41. Review.

Capítulo II

Artigo Científico

Conclusão

Anexos

1. ARTIGO CIENTÍFICO

TLR9 STIMULATION INDUCES INCREASE IN FUNGICIDAL ACTIVITY OF HUMAN DENDRITIC CELLS CHALLENGED WITH *Paracoccidioides brasiliensis*.

Short Title: TLR9 and dendritic cells challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*.

IVY RAFACHO VIEIRA, REGINALDO KELLER FERNANDES, DANIELA RAMOS RODRIGUES, CAROLINA MENDONÇA GORGULHO, ÂNGELA MARIA VICTORIANO DE CAMPOS SOARES

Instituto de Biociências, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Laboratório de Imunologia da Paracoccidioidomicose, São Paulo, Brasil

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, Dendritic cells, TLR9, fungicidal activity, H₂O₂.

ABSTRACT

Microorganisms killing by dendritic cells (DCs) is an important effector mechanism during innate immune response, as it can avoid dissemination of infection during migration of these cells toward draining lymph nodes. However, this function depends on pattern recognition receptors (PRRs) to which the microorganism will bind in these cells. Regarding this, TLR9 activation, by stimulating the oxidative metabolism, induces increase in microbicidal activity of these cells. Accordingly, we showed that DCs treatment with a TLR9 agonist results in an increase in fungicidal activity of these cells against the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which however, was not associated to higher H₂O₂ levels.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep systemic mycosis, endemic to Latin America, caused by the inhalation of mycelial propagules of the thermodynamic fungus *Paracoccidioides* spp¹⁻³. Among the mechanisms of immune response against the fungus, those played by dendritic cells (DCs) deserve to be highlighted. Similarly, to other phagocytic cells, DCs release potent cytotoxic molecules that enable them to efficiently destroy microorganisms. This function represents an important effector mechanism during the innate immune response. The greater or lesser capacity of DCs to destroy the various microorganisms may result in differences in the dissemination of the infection during the migration of these cells from the periphery to the secondary lymphoid organs⁴⁻⁶. In a previous study, we have detected that DCs do not release adequate levels of H₂O₂ and consequently do not develop fungicidal activity against *P. brasiliensis*. The type of PRR to which the fungus binds can determine its fate within DCs. In this context, TLR9 activation results in an increase in peroxide formation and consequent microorganisms killing by DCs⁷. Here, we found that TLR9 activation in human dendritic cells results in an increase in fungicidal activity of these cells against high and low virulent strains of *P. brasiliensis*. However, this process was not associated with increase in H₂O₂ levels.

METHODS

Samples

Peripheral blood was collected from healthy volunteer individuals after signature of informed consent form.

Fungi

Yeast cells of high and low virulent strains of *P. brasiliensis* (Pb18 and Pb265, respectively) were used. Culture and viability determination was performed as previously⁸ and cells concentration was adjusted to 2×10^5 cells/mL.

Generation of dendritic cells

Human DCs were generated from purified monocytes (CD14⁺ cells isolated by magnetic-activated cell sorting (MACS) – (Human CD14 Microbeads, Kit: Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA). Monocytes pellet were suspended in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) 40 mg/mL gentamicin and 10% inactivated fetal bovine serum) (complete culture medium) seeded in six-well tissue culture plates (5×10^6 cells /mL) and allowed to adhere (2 h at 37°C and 5% CO₂) After, supernatants were removed and cultures were incubated with complete culture medium containing 80 ng/mL (nanogram/milliliter) of rH IL-4 and 80 ng/mL of rH GM-CSF (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA) during 7 days, for DCs generation. Loosely adherent cells were collected, checked for viability (trypan blue staining) seeded in to 24-well tissue culture plates (10^6 cells/mL) and treated with 5ug or 10ug/ml of a TLR9 agonist (CPG-ODN-1826) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) or a TLR9 antagonist (5ug / ml) (CPG-ODN-2088) (InvivoGen) for 24h, challenged for 4h and 24h with Pb18 or Pb265 (2×10^5 yeast/mL) (DCs: yeast ratio of 5: 1) and evaluated for fungicidal activity and H₂O₂ production.

Fungicidal activity

Cocultures DCs/fungi were washed with sterile ice water to allow cells lysis and release of fungi that were phagocytosed. The obtained suspensions were considered as experimental cultures. Cultures containing only the fungal suspensions were considered as control cultures. After the washing process (final volume: 2 mL) control and experimental cultures were plated (100µL) in triplicates in Petri dishes containing BHI-agar culture medium at the concentration of 47g/L, plus 4% horse serum, 50 µg/ml gentamycin and 5% growth factor or

aqueous extract⁹. After 8 days of BOD incubation at 36°C, the colony forming units (CFUs) contained in the control and experimental plaques were counted and the percentage of fungicidal activity calculated by using following formula: $1 - (\text{mean of the colony-forming units of the experimental plaques} / \text{mean of the colony forming units of the control plates}) \times 100$.

H₂O₂ production

DCs were treated and challenged with the fungus according to the protocol described above, except that the suspensions of the fungi were diluted in phenol red solution containing 140 mM NaCl; 10mM phosphate buffer pH7; 5.5mM dextrose; 0.56 mM phenol red and 0.01mg/mL of horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). After the challenge period, the reaction was stopped by the addition of 0.01 mL of 1N NaOH and absorbance was determined on an automatic ELISA reader (620nm filter). The results were expressed as nanomoles of H₂O₂/1x10⁵ cells and calculated based on the results obtained in a standard curve constructed with known concentrations of H₂O₂.

Statistical analysis

Differences among cultures were calculated by ANOVA for dependent samples - Tukey Kramer test by using GraphPad Prism 5.0 software. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Stimulation with agonist for TLR9 results in increase in fungicidal activity of human DCs against Pb18 and Pb265.

As expected, we found that no stimulated cells showed low fungicidal activity. However, a significant activity was detected after stimulation with the agonist in relation to both strains and in both periods. It is noteworthy, however, that higher activity was detected after challenge with strain 265 when compared to strain 18.

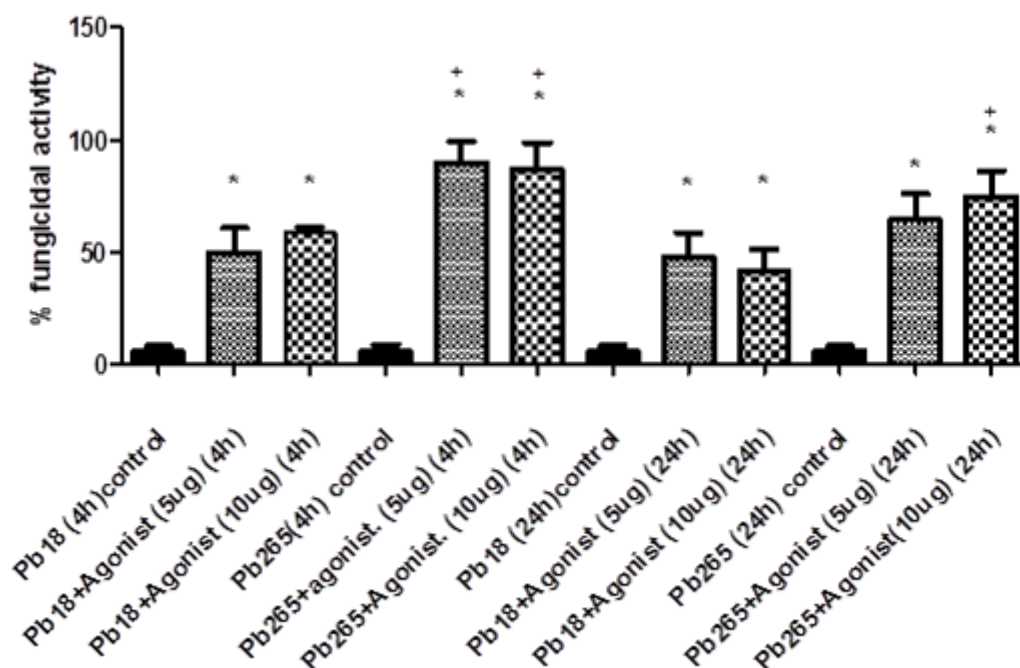


Figure 1. Fungicidal activity of DCs stimulated or not with a TLR9 receptor agonist (5 and 10ug/ml) for 24h and challenged with Pb18 and Pb265 for 4 and 24h. The results are expressed by means $\pm$ standard deviation from results obtained from cultures of 6 subjects. * $p < 0.05$ x respective control + $p < 0.05$ x respective Pb18.

Effect of incubation with the TLR9 receptor antagonist on DCs fungicidal activity

In order to confirm the role of TLR9 in the increase of fungicidal activity, we performed experiments in which the cells were incubated with an antagonist of this receptor. We observed that the fungicidal activity after incubation with the antagonist, for both Pb18 and

Pb265, was similar to that detected with the non-stimulated cells, which confirms that the increase of the fungicidal activity is due specifically to the TLR9 stimulation.

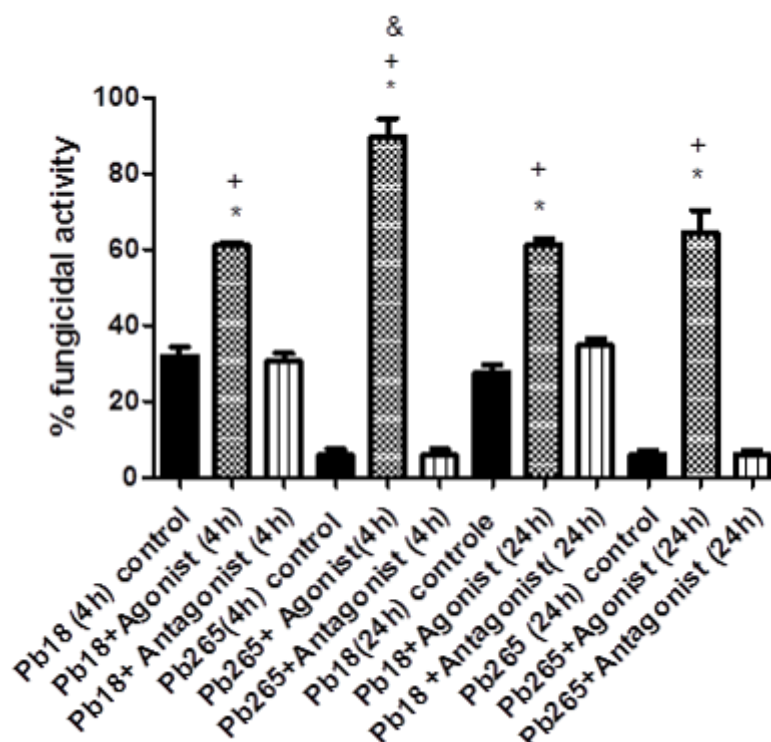


Figure 2. Fungicidal activity of DCs stimulated or not with a TLR9 receptor agonist (5ug/ml) or a TLR9 antagonist receptor (10ug/mL) for 24h and challenged with Pb18 and Pb265 for 4 and 24h. The results are expressed by means $\pm$ standard deviation from results obtained from cultures of six subjects. * $p < 0.05$ x respective control + $p < 0.05$ x respective antagonist & $p < 0.05$ x respective Pb18.

Increase in fungicidal activity was not associated to higher H₂O₂ levels

Unstimulated DCs produced low H₂O₂ levels, that were significantly increased after challenge with Pb18 for 4 h. However, this production remained unchanged when the cells were treated with the receptor agonist, as well as with its antagonist. The same response profile was detected for the other cultures challenged with Pb18 for 24h (B) and Pb265 for 4h (C) and 24 h (D).

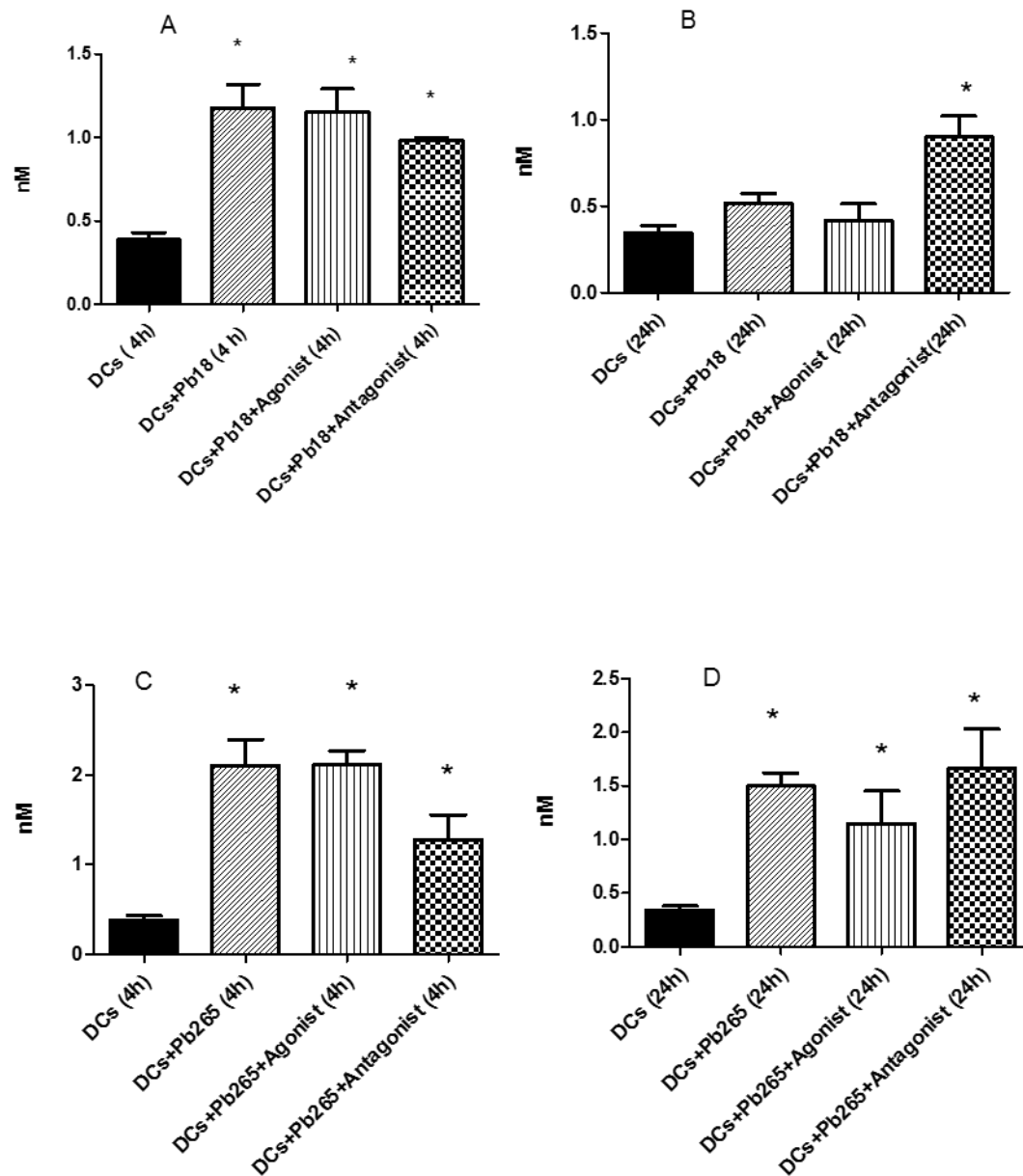


Figure 3: H₂O₂ production by DCs stimulated or not with a TLR9 receptor agonist (5ug/ml) or with a TLR9 antagonist receptor (10ug/mL) for 24h and challenged with Pb18 (A,B) and Pb265 (C,D) for 4 and 24h. The results are expressed by mean $\pm$ standard deviation from results obtained from cultures of six subjects. * $p < 0.05$ x respective DCs.

DISCUSSION

Our results agree with others showing that TLR9 stimulation positively modulates DCs activity¹⁰. In relation specifically to microbicidal activity Lahiri et al.⁷ showed that growth of *Salmonella typhimurium* in human DCs was inhibited by stimulation of these cells with CpG-DNA, a TLR9 receptor agonist. This effect was mediated by an increase in reactive oxygen species production. In addition, they showed that DCs increase their capacity to mature and present antigens to CD4 T cells. Thus, our study should continue in order to evaluate whether TLR9 activation also results in maturation and increase in antigen presentation by DCs, since studies in our lab have already shown that DCs/Pb interaction does not result in maturation of these cells⁸. Our results also corroborate studies with other fungi, such as *Cryptococcus neoformans*¹⁰, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*¹¹, *Aspergillus fumigatus*¹² and mainly with *Paracoccidioides brasiliensis*, that have shown the protector effect of TLR9 by using experimental models of the infection¹³⁻¹⁴. Therein, our results contribute to the literature showing that the TLR9 protector effect during fungal infection is, among other factors, associated with its ability to modulate dendritic cell activity.

The effect of TLR9 has been attributed to its ability to activate the NADPH-oxidase system with a consequent increase in reactive oxygen species production. Our results, however, did not confirm this association, as increase in DCs capacity to kill the fungus was not accompanied by higher H₂O₂ levels. Further experiments will be necessary to explain this literature discrepant data.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (scholarship for student).

DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts of interest. The authors are responsible for the content of the manuscript.

REFERENCES

1. Brummer E., Castaneda E., Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6 (2):89-117.
1. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23 (1): 65-73.
2. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52 (2): 273-83
3. Aline F, Bout D, Dimier-Poisson I. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect Immun.* 2002; 70(5):2368-74.
4. Rescigno M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends Microbiol.* 2002; 10(9):425-61.
5. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* 2003 ;19(1):59-70.
6. Lahiri A.; Das P.; Vani J.; Shaila MS; Chakravorty D. TLR 9 activation in dendritic cells enhances *salmonella* killing and antigen presentation via involvement of the reactive oxygen species. *Plos One.* 2010;5(10):e13772.
7. Fernandes RK, Bachiega TF, Rodrigues DR, *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* Interferes on Dendritic Cells Maturation by Inhibiting PGE₂ Production. *Plos One.* 2015; 10(6):e0131380.
8. Kurita N, Sano A, Coelho KI, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. An improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1993;31(3):201-5.
9. Gowda NM, Wu X, Gowda DC. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J Immunol.* 2012; 15;188(10):5073-85.
10. Zhang Y, Wang F, Bhan U, *et al.* TLR9 signaling is required for generation of the adaptive immune protection in *Cryptococcus neoformans*-infected lungs. *Am J Pathol.* 2010;177(2):754-65.

11. Kasperkovitz PV, Khan NS, Tam JM, Mansour MK, Davids PJ, Vyas JM. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect Immun*. 2011;79(12):4858-67.
12. Kasperkovitz PV, Cardenas ML, Vyas JM. TLR9 is actively recruited to *Aspergillus fumigatus* phagosomes and requires the N-terminal proteolytic cleavage domain for proper intracellular trafficking. *J Immunol*. 2010; 15;185(12):7614-22.
13. Morais EA, Chame DF, Melo EM, *et al*. TLR 9 involvement in early protection induced by immunization with rPb27 against Paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 2016;18(2):137-47.
14. Menino JF, Saraiva M, Gomes-Alves AG, *et al*. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. *Plos Negl Trop Dis*. 2013; 25;7(7):e2317.

2. CONCLUSÃO

Células dendriticas humanas não apresentam atividade fungicida contra as cepas de alta e baixa virulência do *P.brasiliensis*. No entanto, essa atividade aumenta de forma significativa, para as duas cepas do fungo, após o tratamento das células com agonista do receptor TLR9. Esse aumento, no entanto, não esteve associado a aumentos nos níveis de H₂O₂, o metabólito envolvido na morte do fungo pelas outras células fagocitárias.

3. ANEXOS

Anexo 1:

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) utilizado na realização da pesquisa.

Anexo 2:

Comprovante de submissão do artigo científico.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/2012
(Participante maior de 18anos)

CONVIDO, o Senhor (a) _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "Crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* no interior das células dendríticas: mecanismos envolvidos e consequências para as funções dessas células", que será desenvolvido por mim, Ivy Rafacho Vieira, Bióloga, com orientação da profissional também Bióloga e Professora Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do Campus UNESP Botucatu.

Estou estudando uma doença denominada paracoccidioidomicose. Para que eu possa ter um resultado nesse momento, preciso coletar 50ml do seu sangue, pois essas células serão isoladas desse sangue, cultivadas no laboratório e posteriormente estudadas. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

O senhor (a) não será diretamente beneficiado pelos resultados, mas as pessoas que tem essa micose poderão ser beneficiadas no futuro.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que, mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, **CONCORDO EM PARTICIPAR** de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas sem, no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome Ivy Rafacho Vieira (pesquisadora)

Endereço: Rua Doze, nº 22 – Chácara dos Pinheiros, Botucatu-SP CEP: 18609-360

Telefone: (14) 3814-1795 e 99813-5157

E-mail: ivy.raff@yahoo.com.br

Nome: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares (orientadora responsável)

Endereço: Rua Padre Euclides, nº 500 – Vila Maria, Botucatu-SP CEP: 18611-680

Telefone: (14) 3882-5320 e 3880-0417

E-mail: acsoares@ibb.unesp.br

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Medical Mycology

Manuscript ID MM-2016-0383

Title TLR9 stimulation induces increase in fungicidal activity of human dendritic cells challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*

Authors Vieira, Ivy
Fernandes, Reginaldo
Rodrigues, Daniela
Gorgulho, Carolina
Campos Soares, Angela Maria Vitoriano

Date Submitted 21-Dec-2016