

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/07/2018.



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

Bárbara Casella Amorim

**Análise do inflamassoma na paracoccidioidomicose:
correlação entre o tratamento antifúngico e a resposta
imune mediada por monócitos e macrófagos alveolares.**

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.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

**Botucatu
2016**

Bárbara Casella Amorim

Análise do inflamassoma na paracoccidioidomicose:
correlação entre o tratamento antifúngico e resposta imune
mediada por monócitos e macrófagos alveolares

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.

Orientador: Prof.Dr. James Venturini

Botucatu
2016

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

Amorim, Bárbara Casella.

Análise do inflamassoma na paracoccidioidomicose :
correlação entre tratamento antifúngico e resposta imune
mediada por monócitos e macrófagos alveolares / Bárbara
Casella Amorim. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: James Venturini
Capes: 21102007

1. Inflamassomos. 2. Paracoccidioidomicose. 3.
Monócitos. 4. Resposta imune. 5. Antimicóticos. 6. Fibrose
pulmonar.

Palavras-chave: NLRP3; inflamassoma; monócitos;
paracoccidioidomicose.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha avó Lucena (*in memoriam*) por todo amor e dedicação, tenho certeza que de onde estiver está torcendo por mim.

Dedico de maneira especial a Profa. Dra. Maria Sueli Parreira de Arruda por ter aberto as portas do Lipe e ter mudado a minha vida, possibilitando a realização de um sonho. E ao meu amigo e orientador James Venturini por toda paciência, dedicação, ensinamentos e principalmente a amizade.

Agradecimentos

A minha mãe Ivana e ao meu pai Milton por todo o apoio e dedicação de uma vida

Ao Bruno, Cíntia, Artur e Nicolas obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Tietê por compartilhar todo conhecimento e sabedoria e oferecer oportunidades para meu crescimento como profissional e pessoa.

Ao Dr. Ricardo de Souza Cavalcante pela ajuda com os pacientes e por toda a contribuição no trabalho.

A Dra. Ana Carla Pereira Latini pela ajuda essencial para o desenvolvimento do trabalho.

A Dra. Alessandra Pontillo por estar sempre pronta a ajudar e compartilhar conosco todo conhecimento.

A Dra. Maria Therezinha Serrão Peraçoli pela contribuição no trabalho.

Aos amigos do Lipe: Sem vocês meu trabalho não seria possível, agradeço de coração a cada um. Amo vocês!

Camila, Thais e Luiza: pela paciência, ajuda, amizade e por serem verdadeiros exemplos pra mim.

Amanda, Angela e Débora: a vocês meu agradecimento mais que especial. Minhas amigas, meus exemplos e as melhores companheiras que alguém pode ter.

Laysla, Victor, Pedro e Julia: por toda ajuda, amizade e companhia em tantas madrugadas de trabalho.

Babizinha e Rodolfo: pessoas que em tão pouco tempo se tornaram tão especiais pra mim. Obrigada por tanto carinho e ajuda.

Karol, Angelinha e Gaby: por toda parceria, ajuda, carinho, conversas e risadas. Vocês são demais.

E Dani, que ficou conosco menos tempo do que a gente queria mas tempo o suficiente pra fazer parte da família.

Aos amigos do grupo de micoses sistêmicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Thaty, Drica, Pri, Ricardo, Lari e Bia por toda ajuda e amizade que tive desde o início.

Aos queridos do Instituto Lauro de Souza Lima por toda ajuda e companhia Pri Ballalai, Gislaíne, Bia, Mariane, Keren, Giovana, Elderson, Dr. Ida e Dr. Vânia.

E as queridas Amanda, Elô e Pri Medeiros um agradecimento especial pela parceria e em todas as fases do mestrado. Essa caminhada não é fácil, mas sempre fica melhor quando temos pessoas especiais ao nosso lado!

Aos meus amigos da vida: Flávia, Fernanda, Ana Roberta, Cássia, Néias, Heide, Dani Rosa, Carol, Ariana, Juliana Paixão, Juliana Batista, Luiz, Anderson, André, Boy, Dani Cris, Fran, Néia, Renata e Felipe. Com vocês fica tudo mais fácil e divertido. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

A minha família e minha madrinha que sempre estão prontos para ajudar e dividir comigo momentos de alegria e tristezas. Tias, tios, primos e primas vocês são essenciais na minha vida!

A Marly pela ajuda que foi essencial para que tudo isso fosse possível.

Marília e Mariana por me guiarem até esse caminho.

Aos amigos da Unimed Centro-Oeste Paulista pela amizade e incentivo quando resolvi mudar minha história.

Minha afilhada Taís que desde cedo mostra grande paixão pela ciência. Meu orgulho.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação e a secretária Bruna Quirino Jorgetto pela atenção a nós destinada.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, especialmente a Profa. Dra. Alexandrina Sartori por toda dedicação e incentivo.

Aos demais funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu por toda atenção e ajuda quando necessário.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos pacientes envolvidos sem os quais o trabalho não seria possível.

Aos meus fiéis companheiros Lua e Luke por todo amor.

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*. As principais formas clínicas da doença são aguda/subaguda e crônica (FC), sendo que nessa última, a maioria dos pacientes desenvolvem fibrose pulmonar e enfisema. Estudos prévios demonstraram que pacientes FC, na forma ativa da doença, apresentam elevada produção de mediadores inflamatórios, incluindo a IL-1 β . Essa citocina, diferente das demais, é produzida por uma plataforma protéica intracelular denominada inflamassoma que pode ser ativada por patógenos e sinais de dano do hospedeiro. Considerando-se que os mecanismos de ativação do inflamassoma em pacientes com PCM não são conhecidos, o presente estudo teve por objetivo determinar a expressão de genes envolvidos na ativação do inflamassoma e a produção de citocinas por monócitos e macrófagos alveolares de pacientes com PCM em diferentes momentos do tratamento antifúngico. Nossos resultados demonstram a ativação do NLRP3-inflamassoma, caracterizada pela elevada expressão de *NLRP3*, *CASP1* e *IL1B* por monócitos. Esses achados corroboram a contribuição do NLRP3-inflamassoma na patogênese da PCM também em pacientes.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose, inflamassoma, monócitos, tratamento antifúngico

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by species of the genus *Paracoccidioides*. The main clinical forms of the disease are acute/subacute (AF) and chronic (CF), and in the latter, most patients develop pulmonary fibrosis and emphysema. Previous studies showed that CF patients in active disease, exhibit elevated production of inflammatory mediators, including IL-1 β . This cytokine, different from the others, are produced by an intracellular multiprotein platform called inflammasome that can be activated by pathogens and host signs of damage. Considering that the activation mechanisms of the inflammasome in patients with PCM are not know, this study aimed to determine the expression of genes involved in inflammasome activation and cytokine production by monocytes and alveolar macrophages from PCM patients at different times of antifungal treatment. Our results demonstrate the activation of the NLRP3 inflammasome-characterized by high expression of *NLRP3*, *CASP1* and *IL1B* by monocytes. These findings corroborate the contribution of NLRP3-inflamassome in pathogenesis of PCM also in patients.

Keywords: paracoccidioidomycosis, inflammasome, monocytes, antifungal treatment

Lista de Figuras

- **FIGURA 1**

Estrutura dos inflamassomas canônicos e exemplos de agonistas..... 6

- **FIGURA 2**

Ativação do inflamassoma NLRP3..... 6

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
<i>1.1. Paracoccidioidomicose</i>	1
<i>1.2. Imunidade na PCM</i>	2
<i>1.3. Fibrose pulmonar e PCM</i>	3
<i>1.4. Inflamassomas</i>	4
<i>1.5. Inflamassomas e a infecção fúngica</i>	7
2. OBJETIVOS	8
<i>2.1. Objetivo Geral</i>	8
<i>2.2. Objetivos Específicos</i>	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
4. MANUSCRITO	15
5. CONCLUSÕES	40

1.INTRODUÇÃO:

1.1. Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM), descrita por Adolfo Lutz em 1908, é micose sistêmica, granulomatosa, causada pelos fungos termo-dimórficos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* (1,2). Embora seu nicho e habitat natural não sejam totalmente conhecidos, sabe-se que esses fungos vivem em solos úmidos na fase micelial e o único hospedeiro natural bem caracterizado é o tatu *Dasyus novemcintus* (3-5). A instalação da doença ocorre pela inalação de esporos e fragmentos de hifas (forma infectante) que, ao atingirem os pulmões, se transformam em fungos da fase leveduriforme (forma patogênica)(6). Esses fungos se disseminam do parênquima pulmonar para linfonodos regionais, constituindo, em seu conjunto, o complexo primário. Alguns fungos se disseminam, ainda, pela corrente sanguínea e, ou, linfática, podendo atingir qualquer órgão, aparelho ou sistema. (7,8)

Os dados epidemiológicos revelam que a doença é endêmica na América Latina, com elevada prevalência no Brasil, Venezuela e Colômbia, afetando predominantemente indivíduos do sexo masculino (80% no Brasil), com idade entre 30 e 60 anos (9,10). O hormônio feminino estrógeno exerce papel protetor, em mulheres com idade reprodutiva, por inibir a transformação do fungo da fase micelial para a fase leveduriforme, o que favorece a ação de células fagocíticas, principalmente neutrófilos (11,12). Além disso, a maioria dos indivíduos acometidos pela doença são trabalhadores rurais, em fase produtiva, que ao desenvolverem a doença, deixam de exercer suas atividades por problemas respiratórios, levando a diversos problemas socioeconômicos e psicológicos ainda subestimados.(13)

As principais formas clínicas da PCM são aguda/subaguda e crônica. A forma aguda/sub-aguda, também chamada juvenil, em geral compromete crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração (mediana de dois meses) e exibe manifestações clínicas compatíveis com o comprometimento do sistema fagocítico mononuclear. A forma crônica em geral compromete adultos com mais de 30 anos de idade, que apresentam doença de longa duração (em geral acima de seis meses), que acomete pulmões e mucosa das vias aerodigestivas superiores com grande frequência. Muitos pacientes apresentam seqüelas após tratamento da PCM e são classificados como apresentando as formas residuais. (14,15)

O tratamento da PCM é realizado utilizando-se a associação sulfametoxazol-trimetoprim, também chamada de cotrimoxazol (CMX), e os derivados azólicos cetoconazol e itraconazol(ITC)(16-19)

A sulfadiazina é pouco utilizada e a anfotericina B é reservada para casos mais graves, devido à sua toxicidade. Apesar da grande experiência de vários serviços no tratamento da PCM, são raros os estudos duplo-cegos e randomizados. Em 2014, Cavalcante e colaboradores estudaram a comparação entre a utilização do CMX e ITC no tratamento da PCM e observaram que o ITC propiciou cura clínica mais precoce e uma melhor tolerância, confirmando seu uso como a melhor escolha para o tratamento, exceto nos casos em que acomete o sistema nervoso central (20).

1.2. Imunidade na PCM

A resposta imune do indivíduo à infecção pelo *Paracoccidioides* spp determinará a evolução da infecção, uma vez que o desenvolvimento e a progressão da PCM apresentam forte dependência da sua relação com o hospedeiro, o parasita e o meio ambiente (21). Em sua configuração mais ampla, a imunidade do hospedeiro frente a *Paracoccidioides* spp está relacionada a três aspectos fundamentais: 1) a PCM é doença endêmica e acomete indivíduos saudáveis, isto é, que não apresentam condição imunossupressora prévia, como neoplasia ou uso de drogas que afetam a resposta imune, 2) o comprometimento da resposta imune está associado à deficiência específica a antígenos do fungo, ou seja, o paciente possui imunidade preservada para outros antígenos. (22), 3) a resposta do indivíduo ao desafio fúngico depende de fatores, como carga genética, gênero, estado nutricional e tamanho do inóculo inalado.

A morte do *Paracoccidioides* spp ocorre pela ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzido pelos macrófagos (23), que são potencializados pela resposta imune adaptativa do tipo Th₁, caracterizada pela produção de IFN- γ pelos linfócitos ativados, atraídos para o sítio da lesão. Qualquer descompasso, deficiência ou alteração nesse processo leva ao estabelecimento da doença e a sua progressão. Além disso, com a deficiência da resposta Th₁, que em geral inibe a produção de anticorpos, os pacientes passam a apresentar títulos elevados de anticorpos específicos circulantes.

O comportamento imunológico é distinto nas formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC) (24-27). Na FA, que se caracteriza por comprometer pacientes com baixa idade e por um pequeno tempo de instalação da doença – de algumas semanas a poucos meses, observa-se predomínio da produção de citocinas do perfil Th₂/Th₉ (IL-4, IL-5 e IL-9). A produção elevada dessas citocinas acentua a deficiência da resposta imune celular, levando à ausência de reatividade frente a antígenos de *Paracoccidioides* spp. Além disso, as citocinas de perfil Th₂/Th₉ induzem produção muito elevada de anticorpos do isotipo IgG4 (28). Considerando

que este isotipo apresenta capacidade de fixação de complemento reduzida e pequena afinidade pelos receptores FcR, a fagocitose e, conseqüentemente, a eliminação do fungo, tornam-se comprometidas.

A FC, que ocorre devido à reativação de focos latentes (re-infecção endógena) e, portanto, após o hospedeiro ter organizado uma resposta imune adaptativa eficiente frente ao *Paracoccidioides* spp, apresenta instalação lenta e progressiva. À exceção dos que apresentam a forma grave, pacientes com a FC apresentam resposta Th₁ preservada, isto é, à semelhança de indivíduos saudáveis, são reatores ao teste intradérmico com paracoccidioidina. Apresentam ainda, intensa produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-17 e de peróxido de hidrogênio. Embora esses mediadores sejam importantes para a eliminação do fungo, sua superprodução induz efeitos deletérios e não conferem proteção. A produção de anticorpos também pode estar elevada, e se caracteriza por imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgG2 (28), que possuem maior capacidade de fixação de complemento e maior afinidade pelos receptores FcR (IgG1 > IgG2 > IgG4). Embora esse conjunto de elementos seja importante para a eliminação do fungo, a capacidade de lise microbiana não acompanha a multiplicação do fungo e o indivíduo adoce. Por se tratar de processo inflamatório crônico, esses pacientes, em geral, já apresentam fibrose logo no primeiro atendimento clínico, quando se observa produção mais acentuada de TGF- β ₁ e do fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) (29).

1.3. Fibrose pulmonar e PCM

Mesmo após tratamento antifúngico eficaz, a avaliação clínica e radiológica de pacientes com FC revela a presença de fibrose nos diferentes órgãos comprometidos, os pulmões, particularmente, também exibem o enfisema. Essas sequelas levam ao comprometimento funcional e incapacitação do paciente. Após tratamento, a função pulmonar poucas vezes é normal, revelando padrão obstrutivo em 85% dos casos, com freqüências iguais de obstrução leve, moderada e intensa (31-33).

Os achados necroscópicos de pacientes com PCM revelam que a fibrose pulmonar é caracterizada por extensas áreas de depósito de colágeno próximas à região hilar, envolvendo outras estruturas como linfonodos, brônquios e artérias. As fibras colágenas se encontram na periferia dos granulomas e se estendem a brônquios e vasos sanguíneos próximos. A proliferação de fibras reticulares (colágeno III) também ocorre no septo alveolar, inclusive em áreas distantes do processo granulomatoso, sugerindo que o próprio fungo e, ou, seus antígenos podem atuar diretamente sobre a proliferação de fibras reticulares nos alvéolos

pulmonares (33).

Apesar da sua importância, poucos estudos têm focado especificamente a fibrogênese pulmonar que ocorre na PCM. Cock et al.(34) demonstraram em modelo experimental murino que esse processo é precoce. Araujo(35), em estudos necroscópicos demonstrou a presença de fibrose em pacientes que não receberam tratamento antifúngico.

Em geral, durante a evolução da PCM, a função pulmonar encontra-se alterada observando-se hipoxemia com predominância da perfusão sobre a ventilação pulmonar (36). De acordo com os autores, é possível que o envolvimento pulmonar ocorra na fase precoce da doença, uma vez que pacientes com padrão obstrutivo e misto apresentam envolvimento precoce das vias respiratórias com alterações na difusão e ventilação. Mesmo com a regressão das lesões radiológicas após o tratamento, não há recuperação da função pulmonar sendo comum a dispnéia à grandes e pequenos esforços (Lemle et al., 1983). Nesta fase a hipoxemia é sequelar e observada em cerca de um terço dos casos (37).

1.4. Inflamassomas

Tradicionalmente, o sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa do organismo, cuja função primária é eliminar patógenos por diversos mecanismos, dentre os quais estão as barreiras físicas e químicas e os processos biológicos, como a inflamação e a ativação do sistema complemento. Nos processos biológicos inatos que envolvem células, o reconhecimento de moléculas *nonself* ocorre por um sistema sofisticado de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que estão expressos em células como macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais. Famílias já descritas dos PRRs incluem receptores do tipo *toll-like* (TLRs), de lectinas do tipo-C e receptores *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like (NLRs) (38,39). Estes últimos são, ainda, subdivididos em três famílias: NOD, NLRP e IPAF. Esses receptores são intracelulares com domínios bem característicos, podendo apresentar um domínio pirina (PYD) ou um domínio de recrutamento de caspase (CARD). Além disso, alguns deles estão envolvidos tanto no reconhecimento de PAMPs como na detecção de fatores endógenos derivados de estresse celular (DAMP)(40-45). Dentre as vias de sinalização associadas a estes receptores, destacamos a via que leva a montagem de uma estrutura intracelular denominada inflamassoma que tem por consequência a produção de IL-1 β e IL-18 (46), citocinas que participam de maneira importante na indução das respostas Th17 e Th1, respectivamente (47-49).

Dentre os receptores NLRs que são associados ao inflamassoma, os melhores caracterizados são: NLRP1, NLRP3, IPAF ou também chamado NLRP4, AIM2 e IFI16,

pertencentes à família das proteínas HIN que, apesar de não ser estruturalmente associados à família NLRs, foram descritos como ativadores de inflamassoma (50). A formação do NLRP1-inflamassoma é mediada por estímulos específicos como, por exemplo, a presença da toxina letal de *Bacillus anthrax* (51). O AIM2-inflamassoma e o NLRP4 têm possuem estímulos específicos, como DNA virale como flagelina, respectivamente (52,53). O NALP3-inflamassoma, por ser o mais estudado, se caracteriza por sua capacidade de responder a um grande número de agonistas que não possuem origem microbiana necessariamente, mas sinais endógenos. Estudos demonstram, ainda, que o NLRP3-inflamassoma responde a mudança nas concentrações iônicas celulares, especialmente potássio além da ativação por cristais de ácido úrico e ATP extracelular (54,55). A Figura 1 ilustra as estruturas das diferentes famílias dos receptores que ativam o inflamassoma.

Além dos receptores, a estrutura do inflamassoma é constituída por moléculas adaptadoras, coletivamente denominada proteína adaptadora associada a apoptose (ASC), molécula pró-caspase e os precursores de IL-1 β e IL-18. A Figura 2 sumariza os eventos que caracterizam a ativação do NLRP3-inflamassoma. Para que ocorra a ativação do inflamassoma e como consequência a liberação da IL-1 β e IL-18 são necessários dois sinais distintos em que pode-se observar a complementaridade entre os papéis das diferentes famílias de PRRs (54-56).

O primeiro sinal é o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs (como por exemplo, receptores do tipo *toll*) que leva a ativação da via NF-kB com transcrição e tradução das moléculas pró-IL-1 β e pró-IL-18. Um segundo sinal usualmente associados aos DAMPs são reconhecidos pelos receptores intracelulares NLRs que recrutam os demais componentes do inflamassoma e, assim, tem-se a clivagem, via Caspase-1, das citocinas resultando nas suas formas ativas (55-57).

As respostas dos inflamassomas podem ser induzidas por um grande número de estímulos citoplasmáticos que são associados a infecções e estresse celular. Entre os produtos microbianos que atuam como ativadores do inflamassoma estão moléculas bacterianas como flagelina, muramil dipeptídeo, LPS além de RNA bacteriano. Outros indutores conhecidos são substâncias cristalinas derivadas do meio ambiente como asbestos e sílica (58) além de outros estímulos endógenos como ATP extracelular (59) e cristais de ácido úrico (60, 61)

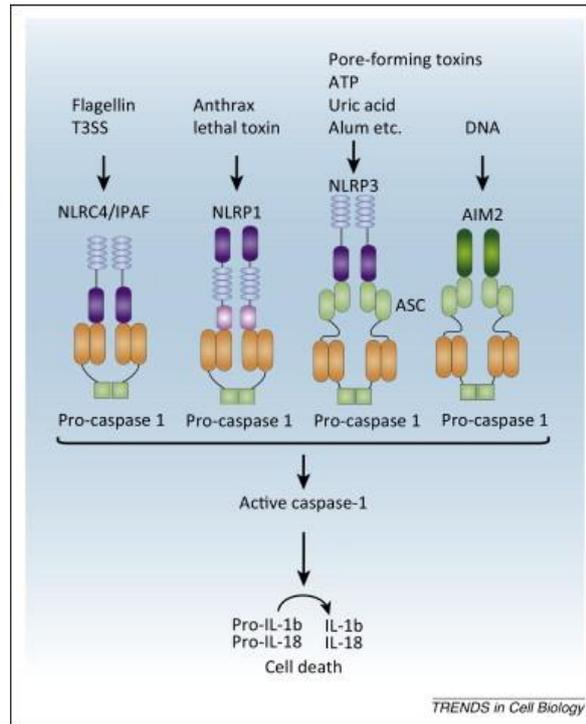


Figura 1. Estrutura dos inflamassomas canônicos e exemplos de agonistas (62).

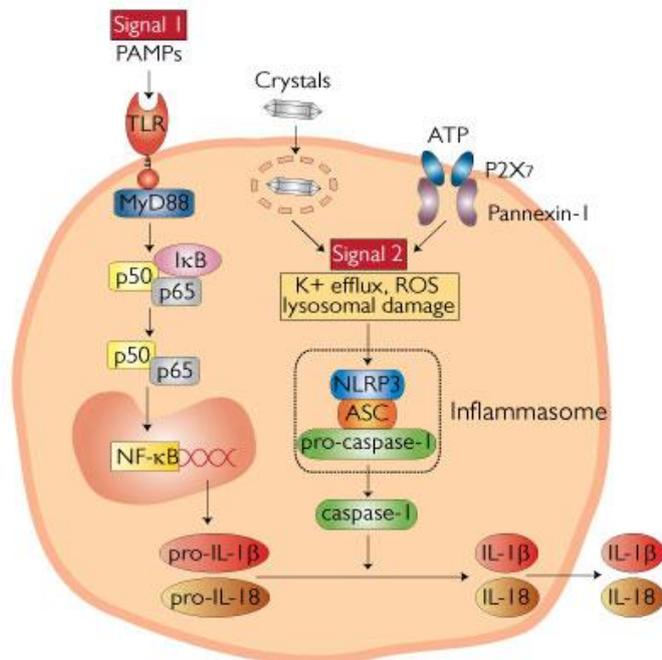


Figura 2. Esquema de ativação do inflamassoma NLRP3 (63). O primeiro sinal ocorre quando PAMPs são reconhecidos por um PRRs que ativa a via NF- κ B induzindo a transcrição e a tradução dos precursores da IL-1 β e IL-18. O segundo sinal ocorre quando um receptor intracelular, como o NLRP3, reconhece PAMPs ou DAMPs induzindo a organização e ativação do inflamassoma, seguida da clivagem dos precursores de IL-1 β e IL-18, pela caspase-1, nas suas formas ativas

1.5. Inflamassomas e infecções fúngicas

Pele e mucosa são exemplos típicos de locais frequentemente expostos à fungos e cabe ao sistema imune do hospedeiro diferenciar os patógenos que fazem parte da microbiota natural daqueles que podem causar as doenças mais graves. Desse modo, e apesar de pouco estudado, o inflamassoma parece ter um papel importante no equilíbrio entre a colonização simbiótica e infecção por fungos, como por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (64-68). Embora existam diferenças nos componentes das paredes celulares desses fungos patogênicos como a β - glucana presente na *C. albicans*, a galactomanana do *Aspergillus* spp e a glucoroxylomanana do *Cryptococcus* sp,(69-74) diversos estudos têm demonstrado a ativação do NLRP3-inflamassoma (75-79).

Os eventos iniciais da infecção fúngica inclui a participação de neutrófilos que controlam a infecção fúngica por atuar na fagocitose de conídios e leveduras e, ou, na liberação de diversas enzimas proteolíticas e NETs (*neutrophil extracellular traps*) em respostas às hifas e micélios (80,81). Embora a IL-1 β possua papel relevante na quimiotaxia dessas células e na amplificação dessa resposta, a IL-1 β não é dependente do NLRP3-inflamassoma pois os neutrófilos são capazes de liberar uma enzima denominada proteinase 3 (PR3) que também possui capacidade de clivar a forma inativa da IL-1 β na sua forma ativa (82). Desse modo, nos estágios mais tardios da infecção, quando a resposta inflamatória torna-se mais dependente das células mononucleares, o inflamassoma é o responsável por atuar na liberação da IL-1 β e IL-18 que contribui na polarização das respostas Th17e Th1 respectivamente (83).

Estudos experimentais recentes têm relacionando a PCM e o inflamassoma. Em 2013, Tavares *et al.*(84) demonstraram que o NLRP3-inflamassoma é ativado pelo *P. brasiliensis* em células dendríticas murinas e que esse mecanismo seria de grande importância para a defesa do organismo contra o fungo. Recentemente, Feriotti *et al.* (2015) (85) observaram que a expressão do receptor Dectina-1 induz expressiva ativação do NLRP3-inflamassoma e que esse mecanismo estaria associado com a resistência do hospedeiro frente ao fungo e Ketelut-Carneiro *et al* (2015) (86) demonstraram que a IL-18 liberada pela ativação do NLRP3-inflamassoma induz a uma resistência antifúngica pelo hospedeiro.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. 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.* Aug;52(2):273-83.
2. Lutz A.(1908) Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brasil Med* ,22:121–124.
3. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR.(1986) Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Méd Trop S Paulo*; 28(1):19-27.
4. Vidal MSM, Melo NT, Garcia NM, Del Negro GMB, Assis CM, Heins-Vaccari EM (1995) . *Paracoccidioides brasiliensis*: a mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Rev Inst Med Trop S Paulo* ; 37: 43-9.
- 5.Peraçoli MTS, Sugizaki MF, Mendes RP, Neiff R, Montenegro MR.(1999) *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. *Mycopathologia*, v. 148, p. 123-130.
6. Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Barbosa, FH, Montenegro MR.(2003) High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): An ecological study. *Medical Mycology*, v. 41, n. 3, p. 217-223.
7. Franco M.(1986) Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* ;25: 5-18.
8. McEwen JG, BedoyaV, PatinoMM, SalazarME, Restrepo A.(1987) Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Micol* 25: 165–75.
9. Martinez R.(2015)Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo. Sep*;57 Suppl 19:11-20.
11. Aristizabal, BH.; Clemons, KV.; Stevens, DA.; Restrepo, A.(1998) Morfological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* comidis to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infection and Immunity*, v.66, p.5587-5591.
12. Aristizabal, B.H.; Clemons, K.V.; Cock, A.M.; Restrepo, A.; Stevens, D.A.(2002) Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: Influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Medical Mycology*, v.40, p.169-178.
14. Mendes RP; Shikanai-Yasuda MA.(2003) Paracoccidioidomicose. In: Cimerman S; Cimerman B. *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu. p. 505-45.
15. Mendes RP (1994) The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 233–258.

16. Ribeiro DO (1940) Nova terapêutica para a blastomicose. *Publ Med (S Paulo)*,1940, 12: 36–54.
17. Lacaz CS , Sampaio SAP (1958) Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares. *Rev Paul Med* 52: 443–450.
18. Barbosa W , Vasconcelos WM (1973) Ação da sulfamatoxazol associada a trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Rev Pat Trop* 2: 329–339
19. Negroni R, Palmieri O, Koren F, Tiraboschi IN, Galimberti RL (1987) Oral treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis with itraconazole in humans. *Rev Infect Dis* 9 (S1) S47–S50. doi: 10.1093/clinids/9.supplement_1.s47
20. Cavalcante RdS, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP (2014) Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(4): e2793
21. Franco, M., Peracoli, M.T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R.P., Meira, D.A., (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 5, 115–149.
22. Benard, G., Hong, M.A., Del Negro, G.M., Batista, L., Shikanai-Yasuda, M.A., Duarte, A.J., (1996). Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 7–12.
23. Carmo, J.P.M., Dias-Melicio, L.A., Calvi, S.A., Peraçoli, M.T.S., Soares, A.M.V.C., (2006). TNF-alpha activates human monocytes for Paracoccidioides brasiliensis killing by an H2O2-dependent mechanism. *Med. Mycol.* 44, 363–368.
24. de Castro, L.F., Ferreira, M.C., da Silva, R.M., Blotta, M.H. de S.L., Longhi, L.N.A., Mamoni, R.L.(2013). Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J. Infect.* 67, 470–485..
25. Mamoni, R.L., Blotta, M.H.S.L.(2006). Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 35, 207–216.
26. Mota, N.G., Peraçoli, M.T., Mendes, R.P., Gattass, C.R., Marques, S.A., Soares, A.M., Izatto, I.C., Rezkallah-Iwasso, M.T.(1988). Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 26, 105–111.
27. Mota, N.G., Rezkallah-Iwasso, M.T., Peraçoli, M.T., Audi, R.C., Mendes, R.P., Marcondes, J., Marques, S.A., Dillon, N.L., Franco, M.F.(1985). Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 765–772.
28. Juvenale, M., Del Negro, G.M., Duarte, A.J., Benard, G.(2001). Antibody isotypes to a Paracoccidioides brasiliensis somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J. Med. Microbiol.* 50, 127–134.

29. Venturini J, Cavalcante R, de Assis Golim M, Marchetti C, de Azevedo P, Amorim BC.(2014) Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. *BMC Infect Dis* ;14:552.
30. Campos, E.P., Padovani, C.R., Cataneo, A.M.(1991). [Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 33, 267–276.
31. Campos, E.P., Cataneo, A.J.(1986). [Pulmonary function in 35 patients with paracoccidioidomycosis]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 28, 330–336.
32. Lemle, A., Wanke, B., Miranda, J.L., Kropf, G.L., Mandel, M.B., Mandel, S.(1983). Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). An analysis of the obstructive defect. *Chest* 83, 827–828.
33. Tuder, R.M., el Ibrahim, R., Godoy, C.E., De Brito, T.(1985). Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 92, 179–188.
34. Cock, A.M., Cano, L.E., Vélez, D., Aristizábal, B.H., Trujillo, J., Restrepo, A., (2000). Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42, 59–66.
35. Araujo, S.(2011). Contribuição ao estudo anátomo-clínico da paracoccidioidomicose em Minas Gerais. Meio século de experiência – Avaliação das necropsias realizada no período compreendido entre 1944 até 1999, no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (Dissertação). Universidade Federal de Minas Gerais.
36. Afonso, J. E., Nery, L. E., Romaldini, H., Bogossian, M. & Ribeiro-Ratto, O.(1979) [Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis)]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 21, 269–280.
37. Mendes, R. P. et al. (1996) Evaluation of the pulmonary sequela in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29, 111.
38. Medzhitov R, Janeway CA. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4–9
39. Medzhitov R, Janeway CA. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298–300
40. Martinon F, Tschopp J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26:447–54
41. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. (2001). Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291:1279–84
42. Tschopp J, Martinon F, Burns K. (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:95–104

43. Inohara N, Nuñez G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* 3:371–82
44. Lich JD, Ting JP. (2007) CATERPILLER (NLR) family members as positive and negative regulators of inflammatory responses. *Proc. Am. Thoracic Soc.* 4:263–66
45. Proell M, Riedl S, Fritz J, Rojas A, Schwarzenbacher R. (2008) The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS ONE* 3:e2119
46. Martinon F, Burns K, Tschopp J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol. Cell* 10:417–26
47. Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K, Paul W. (2009) IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13463-8.
48. Mills KH, Dungan LS, Jones SA, Harris J. (2013) The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *J Leukoc Biol.* 2013 Apr;93(4):489-97.
49. Akira S. (2000) The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000 Feb;12(1):59-63.
50. Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G. (2009) An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol.* Mar;10(3):266-72.
51. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, et al. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol. Cell* 25:713–24
52. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* Mar 26; 458(7237):509-13.
53. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI. (2006) Aderem Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol.* Jun; 7(6):569-75
54. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. (2011) The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev.* Sep;243(1):136-51
55. Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27: 229–265
56. Bauernfeind F, Hornung V (2013) Of inflammasomes and pathogens-sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med* 5: 814–826
57. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA (2011) Inflammasome

- activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 32: 110–116
58. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J.(2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**: 674–677.
59. Laliberte, R.E., Eggler, J., Gabel, C.A.(1999) ATP treatment of humans monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *The journal of biological chemistry.* ; 274(52):36944-51.
60. Shi Y. , Evans, J.E., Rock, K.L.(2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*; 425(6957):516-21.
61. Chen C.J., Shi Y., Hearn A., Fitzgerald F, Golenbock D, Reed G., et al.(2006) MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The journal of clinical investigation*; 116(8):2262-71
62. Vanaja, S. K., Rathinam, V. A. & Fitzgerald, K. A. (2015) Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* **25**, 308–315.
63. Activation of the inflammasome-Review [homepage da internet] [acessado em 10-07-2016]. Disponível em <http://www.invivogen.com/review-nlrp3-inflammasome>.
64. Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM (2010) *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS one* 5: e10008.
65. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, et al. (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459: 433–436
66. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, et al. (2009) An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 5: 487–497
67. Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, et al. (2009) Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* 183: 3578–3581
68. Lei G, Chen M, Li H, Niu JL, Wu S, et al. (2013) Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Res* 23: 965–968
69. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG.(2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* ;**10**:112–122.
70. Beauvais A, et al.(2007) An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*;**9**:1588–1600.
71. Morelle W, Bernard M, Debeauvais JP, Buitrago M, Tabouret M, Latge JP.(2005) Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* ;**4**:1308–1316.
72. Amanianda V, et al.(2009) Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne

fungal spores. *Nature* ;**460**:1117–1121.

73. McFadden DC, Casadevall A.(2001) Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* ;**39**(Suppl 1):19–30.

74. Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR.(2004) Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol*;**52**:13–24.

75. Lamkanfi M, Malireddi RK, Kanneganti TD.(2009) Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem*;**284**:20574–20581.

76. Kumar H, et al.(2009) Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *J Immunol* ;**183**:8061–8067.

77. Kankkunen P, Teirila L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (2010)(1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* ;**184**:6335–6342.

78. Lei G, et al.(2013) Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Res*;**23**:965–968.

79. Guo C, et al.(2014) Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes Infect* ;**16**:845–854.

80. Della Coletta AM, Bachiega TF, de Quaglia e Silva JC, Soares ÂM, De Faveri J, Marques SA, Marques ME, Ximenes VF, Dias-Melicio LA.(2015) **Neutrophil** Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation In Vitro. *PLoS Negl Trop Dis*. Sep 1;9(9)

81. Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, de Almeida Balderramas H, Rodrigues DR, Ximenes VF, de Campos Soares ÂM. (2016)Participation of dectin-1 receptor on NETs release against Paracoccidioides**brasiliensis**: Role on extracellular killing. *Immunobiology*. Feb;221(2):228-35.

82. Joosten LA, et al.(2009) Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*;**60**:3651–3662.

83. van de Veerdonk FL, et al.(2011) The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis.*Eur J Immunol* ;**41**:2260–2268.

84. Tavares AH, Magalhaes KG, Almeida RD, Correa R, Burgel PH, Bocca AL.(2013) NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* ;**7**:e2595.

85. Feriotti C., Bazan S.B., Loures F.V., Araújo E.F., Costa T.A., Calich V.L.(2015) Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol*. Sep 3;6:913

86. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, Silva JS.(2015) IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram pela primeira vez a ativação do NLRP3-inflamassoma, caracterizada pela elevada expressão de *NLRP3*, *CASP1* e *IL1B* por monócitos de pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose em relação aos indivíduos saudáveis.