

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

Aline Arruda de Oliveira

Atividade fungicida de células dendríticas humanas contra o *Paracoccidioides brasiliensis*: papel dos metabólitos do oxigênio, citocinas e receptores de reconhecimento padrão

BOTUCATU – SP

2014

ALINE ARRUDA DE OLIVEIRA

Atividade fungicida de células dendríticas humanas contra o *Paracoccidioides brasiliensis*: papel dos metabólitos do oxigênio, citocinas e receptores de reconhecimento padrão

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

BOTUCATU – SP

2014

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

Oliveira, Aline Arruda.

Atividade fungicida de células dendríticas humanas contra o *Paracoccidioides brasiliensis*: papel dos metabólitos do oxigênio, citocinas e receptores de reconhecimento padrão / Aline Arruda Oliveira. - Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Capes: 21102007

1. Paracoccidioidomicose. 2. Resposta imune. 3. Fungicidas - Efeito fisiológico. 4. Citocinas. 5. Imunidade celular.

Palavras-chave: Células dendríticas; Crescimento fúngico; PRRs; *Paracoccidioides brasiliensis*.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, dos quais tenho imenso orgulho por se aventurarem no mundo da pesquisa e enfrentarem comigo essa batalha.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, por conseguirem reduzir a distância e serem sempre o colo acolhedor tanto nos momentos bons quanto ruins. À Lilia, minha mãe, que a cada dia se torna meu maior exemplo, meu espelho. Ao meu pai, Newton, que me acalma lembrando sempre que “só não há jeito para a morte”. E ao meu irmão, Arthur, que, mesmo com todas as nossas diferenças físicas, consegue ser tão semelhante a mim.

À Prof^a. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, por me abrir as portas para a pesquisa, por ser mais que orientadora, ser uma verdadeira mãe. Por estar sempre pronta para ouvir, discutir, aconselhar, acalmar e ajudar. À toda a equipe do laboratório de Imunologia da Paracoccidiodomicose, por me receber, me ajudar, me ensinar e me guiar. À minha “mãe científica”, Tatiana Fernanda Bachiega Pinelli, que esteve do meu lado sempre, para rir, chorar, brigar, desabafar. Ao Régis Keller Fernandes, que teve toda a paciência do mundo para me inserir no mundo das dendríticas e me passar todo seu conhecimento. E à Daniela Rodrigues, que desde o meu primeiro dia esteve disposta a me ajudar.

Agradeço àqueles que passaram na minha vida em Botucatu e que, com certeza, deixaram um pedaço deles e levaram um pedaço de mim. Principalmente à Fossets (Thayssa Rabello Schley) que me ensinou a levar a vida de um jeito mais leve sem deixar as responsabilidades de lado, à Tchimi (Maura Pacios) por me mostrar que ser feliz é não se importar com o que os outros pensam, à Son (Patricia Lobo dos Reis) por me dar coragem para enfrentar os maiores desafios, ao Cuaçado (Renan Freitas) e ao Gabiru (Gabriel Cohen) pela companhia, apoio e diversão durante toda a faculdade, mas principalmente, nos momentos mais difíceis.

Agradeço também, à Tarra (Juliana Carvalho), minha gêmea de mãe diferente, que caminhou ao meu lado desde o começo, dividindo experiências, enfrentando problemas, sorrindo, chorando, desabafando e sempre me entendendo mesmo quando nem eu mesma conseguia me entender. À Cascu (Nina Camargo), que consegue com toda sua meiguice e delicadeza amolecer a cada dia um pouquinho do meu coração. E à Judi (Carolina Vaccari) que, principalmente nos últimos tempos, tem sido tão companheira nos momentos de diversão que nos desligam de todos os problemas. À Marcela D’Ambrósio, eterna Bunceps, que não deixou de estar ao meu lado nem morando em outro continente, que está comigo “desde o início, e mesmo longe, até o fim”.

E, por fim, mas com a mesma gratidão, agradeço ao Lito e ao Pélinha (Luis Otávio Targa e Bruno Kanno), que me ajudaram a chegar e a ficar em Botucatu por todos esses anos.

“Para fluir comigo, a vida pedia que eu soltasse o medo e me entregasse. Que dissesse sim. Que acreditasse nela. Eu não sabia como fazer, mas sentia, entre as contrações, que ela estava fazendo por mim, através de cada experiência que eu atraía para o meu caminho.”

Ana Jácomo

Resumo

OLIVEIRA, A. A. Atividade fungicida de células dendríticas humanas contra o *Paracoccidioides brasiliensis*: papel dos metabólitos de oxigênio, citocinas e receptores de reconhecimento padrão. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). A resposta imune inata desempenha um papel fundamental na relação hospedeiro/parasita nas infecções por fungos, com enfoque para as células fagocitárias, que exercem fundamentalmente atividades efetoras diretas como fungicida e fungistática. Nesse sentido, neutrófilos, monócitos humanos e macrófagos murinos exercem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* após a ativação com citocinas como IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15. Esse processo envolve a participação dos metabólitos do O₂, particularmente a H₂O₂. Diferente dessas células, as células dendríticas (DCs) têm um papel essencialmente modulador, isto é, de induzir e instruir a resposta imune específica subsequente. No entanto, como as outras células fagocitárias, as DCs produzem importantes moléculas citotóxicas, permitindo que as mesmas potencialmente tenham igual capacidade de desempenhar atividades efetoras diretas. A maior ou menor capacidade das DCs destruírem os microrganismos pode resultar em diferenças na disseminação dos mesmos durante a migração dessas células da periferia até os órgãos linfóides secundários. Neste contexto, um dos objetivos do presente projeto foi avaliar se DCs humanas exercem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* e se esse processo envolve a ativação do sistema NADPoxidase com consequente produção de H₂O₂. Um segundo objetivo foi avaliar a participação de diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs), assim como a de citocinas ativadoras como IFN- γ , GM-CSF e TNF- α nessa atividade. Detectamos diferente do esperado, que as DCs não desenvolvem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*; ao contrário, permitem o crescimento do fungo no seu interior, principalmente quando desafiadas com a cepa virulenta do Pb (Pb18) durante 4 horas. Essa atividade não foi detectada mesmo após o processo de ativação, uma vez que houve apenas uma diminuição do crescimento fúngico, quando as células foram pré-incubadas com IFN- γ , GM-CSF ou TNF- α . Além disso, quando as células foram desafiadas por 24 horas, a pré-incubação com citocinas resultou em um aumento ainda maior do crescimento fúngico. Os resultados ainda mostraram que todos os PRRs testados como o TLR2, o receptor de manose, o DC-SIGN e o dectina-1 podem estar envolvidos no crescimento fúngico no interior das DCs. No entanto, tenderam a mostrar uma maior participação do dectina-1.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, células dendríticas, PRRs, atividade fungicida

Abstract

OLIVEIRA, A. A. **Fungicidal activity of dendritic cells against *Paracoccidioides brasiliensis*: role of oxygen metabolites, cytokines and pattern recognition receptors.** 2014. Dissertation – Bioscience Institut of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). The innate immune response plays a key role in the host / parasite relationship in fungal infections, with a focus on phagocytic cells, which mainly exert direct effector activities such as fungicidal and fungistatic. Accordingly, neutrophils, human monocytes and murine macrophages exert fungicidal activity against *P. brasiliensis* after activation with cytokines such as IFN- γ , TNF- α , GM-CSF and IL-15. This process involves the participation of O₂ metabolites, particularly H₂O₂. Unlike these cells, dendritic cells (DCs) essentially play a modulatory role, since they are involved in the induction and instruction of the subsequent specific immune response. However, like other phagocytic cells, DCs release several cytotoxic molecules, which allow them to have equal capacity to perform direct effector activities. Greater or lesser capacity of DCs to destroy microorganisms can result in differences in the dissemination of the infection, during the migration of these cells from the periphery to the secondary lymphoid organs. In this study we asked whether human DCs exert fungicidal activity against *P. brasiliensis* and whether this process involves activation of NADPoxidase system, with consequent release of H₂O₂. We also aimed to evaluate the participation of different pattern recognition receptors (PRRs) and activating cytokines such as IFN- γ , GM-CSF and TNF- α in this activity. Different than expected, we detected that DCs do not exert fungicidal activity against *P. brasiliensis*; on the contrary, support growth of the fungus inside them, particularly when challenged with the virulent strain of Pb (Pb18) for 4 hours. This activity was not detected even after the activation process, since there was only a reduction in fungal growth when cells were pre-incubated with IFN- γ , GM-CSF or TNF- α . Furthermore, when cells were challenged for 24 hours, pre-incubation with cytokines resulted in an additional increase of fungal growth. The results also showed that all PRRs tested as TLR2, mannose receptor, DC-SIGN and dectin-1 may be involved in fungal growth within DCs. However, they tended to show greater involvement of dectin-1.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, dendritic cells, PRRs, fungicidal activity

Sumário

Resumo

Abstract

1. Introdução	9
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1. Geração de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico	19
3.2. Imunofenotipagem das células dendríticas obtidas dos monócitos.....	19
3.3.Cultivo do fungo	20
3.4.Obtenção da suspensão de <i>P. brasiliensis</i> e teste de viabilidade	20
3.5.Avaliação da recuperação de fungos viáveis	21
3.6.Avaliação da produção de H ₂ O ₂	22
4. Síntese dos resultados obtidos e alterações no delineamento experimental	23
5. Resultados	24
6. Discussão.....	33
7. Referências Bibliográficas.....	39

1. Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo imperfeito e dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* e quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos, e na forma de micélio no ambiente, com variação de 4 a 28°C (Brummer *et al*, 1993).

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 específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (Oliveira, 2002). Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente 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).

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 da específica (Benard, 2008; Calich *et al*, 2008a). Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência aos fungos, destacando-se a

participação na reação inflamatória e na atividade fungicida/fungistática (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 (McEween *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 *et al*, 1992) ou pela via da lectina (Toledo *et al*, 2010). O reconhecimento pode ainda ocorrer via receptores do tipo Toll (TLRs) (Calich *et al*, 2008b, Bonfim *et al*, 2009) ou ainda do tipo manose (Popi *et al*, 2002). Além da fagocitose do fungo, essas células liberam quimiocinas importantes para o recrutamento de novas células ao pulmão. Assim, peptídeos de baixo peso molecular, detectados no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos são capazes de atrair neutrófilos para a cavidade peritoneal (Calich *et al*, 1985a). Outros estudos mostraram a liberação de quimiocinas específicas para neutrófilos e células mononucleares no pulmão de camundongos infectados (Souto *et al*, 2003).

As células fagocitárias residentes ou as recrutadas poderão destruir o fungo após o processo de fagocitose. No entanto, as funções efetoras diretas dessas células contra o fungo, como atividade fungicida e ou fungistática, assim como sua atividade moduladora sobre a resposta inflamatória que está se formando, dependerão das complexas interações que essas células irão estabelecer com o fungo. Esse processo poderá culminar em ativação ou desativação dessas células, à medida que o fungo lançar mão de seus mecanismos de escape. Entre os mecanismos de ativação está a liberação de citocinas ativadoras das funções celulares, como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF e outras como a IL-15. Vários trabalhos *in vitro* têm evidenciado a participação dessas citocinas no processo de ativação de monócitos, macrófagos e neutrófilos humanos e murinos para que essas células adquiram atividade fungicida contra o fungo (Brummer *et al*, 1988 a e b, 1989; Cano *et al*, 1992 a e b, Moscardi-Bacchi *et al*, 1994; Cano *et al*, 1998; Kurita *et al*, 1999; González *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). Por outro lado, fatores que levam a uma desativação dessa resposta tem sido relatados, como a IL-10, que bloqueia a ativação por IFN- γ ou TNF- α de macrófagos murinos (Moreira *et al*, 2010) e neutrófilos humanos (Costa *et al*, 2007), culminando na inibição da atividade fungicida dessas células.

Estes resultados *in vitro* permitem inferir que, durante a resposta imune inata, a resposta de macrófagos contra o fungo estaria inibida, uma vez que estas células, em resposta ao fungo, poderiam produzir proporcionalmente baixas concentrações de citocinas ativadoras como o TNF- α e altas concentrações de IL-10, que de uma forma autócrina desativaria as células. Nesse sentido, monócitos de pacientes produzem baixos níveis de TNF- α e IL-6, mas altos níveis de IL-1, IL-8 e IL-10 quando comparados aos indivíduos controles (Peraçoli *et al*, 2003). Outro mecanismo de supressão das células fagocitárias foi relatado por nosso grupo. Diferente de outros microrganismos que induzem apoptose nas células fagocitárias, como um mecanismo de escape, o *P. brasiliensis* através da indução de IL-8, aumenta o tempo de sobrevivência de neutrófilos humanos. Esse processo provavelmente permite que o fungo permaneça por mais tempo dentro de um ambiente celular propício à sua multiplicação (Acorci *et al*, 2009).

Outros mecanismos que culminam em inibição das células fagocitárias envolvem a ligação do fungo a determinados receptores de reconhecimento de estruturas padrões (PRRS). 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 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 TLRs, na atividade de neutrófilos humanos desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* sugerem que a interação do fungo com os receptores TLR2 e TLR4 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 suas funções efetoras 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 conseqüentemente a produção de citocinas pró e antiinflamatórias 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 susceptíveis (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. Trabalho recente em nosso laboratório mostrou que a IL-18 induz um aumento do crescimento do *P. brasiliensis* em monócitos humanos. Esse efeito foi atribuído ao fato da IL-18 aumentar a expressão de MR. Após a ligação do fungo a esses receptores, seriam emitidos sinais de ativação importantes para a produção de substâncias, que de uma forma direta ou indireta estimulariam o crescimento do fungo (Dias-Melicio *et al*, 2011). Além dos fagócitos, as células “Natural Killer” (NK) podem ter uma importante atividade antifúngica e moduladora durante a resposta imune inata. Estudos *in vitro* demonstraram que células NK murinas podem inibir o crescimento do fungo (Jimenez & Murphy, 1984). No entanto, essas células apesar de serem encontradas em número elevado em pacientes com PCM, desempenham baixa atividade citotóxica (Peraçoli *et al*, 1991). No início de uma infecção experimental em hamster foi detectada uma significativa atividade dessas células que, no entanto, foi diminuindo à medida que a infecção progrediu (Peraçoli *et al*, 1995). Estudos recentes mostraram que células NK podem participar ativamente da resposta contra o fungo, destruindo as leveduras via 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. No entanto, o mesmo estudo mostrou que pacientes com PCM apresentam menor atividade citotóxica dessas células em comparação aos indivíduos controles (Longhi *et al*, 2012).

Em relação à resposta imune adaptativa, a resistência na PCM relaciona-se a um padrão de resposta do tipo Th1 (Oliveira *et al*, 2002; Mamoni&Blotta, 2005, 2006). Nesse sentido, estudos mostraram que pacientes com a forma aguda ou juvenil apresentam produção aumentada de IgG4, enquanto pacientes com a forma

crônica apresentam níveis mais elevados de IgG1. Na forma juvenil, além de IgG4, ocorre produção aumentada de IgE, IgA, eosinofilia periférica e baixos níveis de IL-8 (Baida *et al*, 1999; Mamoni *et al*, 2002), sugerindo que na PCM existe uma predominância de uma resposta do tipo Th2, particularmente nas formas mais graves e disseminadas da doença. Confirmando esses achados, animais sensíveis à infecção apresentam altos níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG1 e IgG2b específicos para o fungo (Calich *et al*, 1985 b; Cano *et al*, 1995). Reforçando os dados de subclasses de anticorpos, 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, níveis indetectáveis de IL-4, IL-5 e IL-10, e aumentados de IFN- γ . No entanto, 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 àqueles com a forma crônica da doença (Oliveira *et al*, 2002). Outros trabalhos reforçam esses achados demonstrando que pacientes com PCM produzem baixos níveis de IL-2 e IFN- γ , e altos níveis de IL-10, que foram associados à 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. Os pacientes com a forma menos grave apresentaram níveis semelhantes de CXCL-10 e IFN- γ e maiores de CXCL-9, quando comparados aos indivíduos com paracoccidiodomicose-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). Outros trabalhos associaram mais uma vez indivíduos paracoccidiodomicose-infecção ao polo 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 e CXCL-10 e CXCR4 e um baixo número de monócitos expressando IL-10 (Mamoni&Blotta, 2006).

Os pacientes com PCM ainda 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 reforçam os achados humanos. Os camundongos suscetíveis liberam um padrão de citocinas do tipo Th2 e os resistentes um padrão Th1 (Calich&Kashino, 1998; Almeida et al, 2001; Kashino et al, 2000; Livonesi et al, 2008). Estudos têm mostrado que outros mecanismos, além de polarização para uma resposta do tipo Th2, podem estar envolvidos na depressão da resposta imune celular na PCM. Um deles seria a produção de óxido nítrico, que embora seja um dos metabólitos envolvidos na destruição do fungo pelos macrófagos, quando produzido em excesso torna-se imunossupressor (Souto et al, 2000; Nascimento et al, 2002; Bocca et al, 1998). Células T com fenótipo regulador podem também contribuir para esse processo. Essas células têm sido detectadas em pacientes (Cavassani et al, 2006; Ferreira et al, 2010) e modelo experimental, no qual foi demonstrado que a migração das mesmas, mediada por CCR5, acarreta intensa imunossupressão e sobrevivência do fungo (Moreira et al, 2008b). Outros estudos têm mostrado uma associação entre hiporesponsividade de células T de pacientes com aumento na expressão de enzimas indutoras de apoptose (Cacere et al, 2009), assim como alta expressão de moléculas de superfície celulares relacionadas a esse processo, como FAS-FASL. A expressão de moléculas co-estimulatórias responsáveis pelo envio de sinais de desativação das células T, como a CTLA-4, também tem sido associada a não resposta de células T aos antígenos fúngicos (Campanelli et al, 2003). Outro mecanismo imunossupressor envolve as células T citotóxicas. Células CD8 de pacientes encontram-se menos ativadas e expressam menores níveis de receptores para a IL-15 e de grânulos citotóxicos quando comparadas aos dos indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção (Burlandi-Soares et al, 2010). A natureza da interação microorganismos/células apresentadoras de antígeno se constitui em um dos principais fatores que definem o desenvolvimento da resposta imune adaptativa contra os patógenos. Assim, nos últimos anos os estudos têm apostado no melhor entendimento dessa interação para explicar a existência de respostas polarizadas Th1 ou Th2 na paracoccidiodomicose.

As células dendríticas (DCs) são essenciais para o reconhecimento inicial de patógenos e para a indução de uma resposta específica do hospedeiro (Steinman, 1991). DCs imaturas residentes em diferentes tecidos e órgãos são capazes de capturar e processar antígenos (Cella *et al*, 1997). Após ativação por microorganismos, LPS ou citocinas como IL-1, GM-CSF ou TNF- α , essas células migram para os linfonodos e baço onde ativam as células T não sensibilizadas. Durante essa migração, as DCs sofrem um processo de maturação que é crucial para o desenvolvimento dessas células em potentes células apresentadoras de antígenos. Durante esse processo, as DCs perdem a capacidade de capturar e processar antígenos, aumentam a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), de moléculas coestimulatórias (CD40, CD80, CD86) e de adesão (CD54), bem como a produção de IL-12. Essa citocina por sua vez, desempenha importante papel na indução de uma resposta imune mediada por células e na produção de IFN- γ por células T e NK (Furgier-Vivier *et al*, 1997). Nesse sentido, recentemente, foi demonstrado que após a infecção com o *P. brasiliensis* ocorrem alterações importantes nas células dendríticas pulmonares que incluem a expressão de receptores para quimiocinas e outras moléculas com conseqüente 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 (Santos *et al*, 2011). Esses resultados corroboram outros do mesmo grupo mostrando 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*, 2004). Por outro lado, estudo bastante recente objetivando avaliar o perfil transcricional de células dendríticas em resposta a infecção pelo fungo mostrou que genes codificadores das citocinas IL-12 e TNF e as quimiocinas CCL22, CCL27 e CXCL10 estão positivamente regulados mostrando que o fungo induz uma potente resposta pró-inflamatória (Tavares *et al*, 2012). Fornazim *et al* (2008), mostraram que DCs humanas geradas na presença do fungo exibem um fenótipo típico de células apresentadoras de antígenos maduras, expressando CD83, CD80, CD86 e CCR7 e com capacidade de produzir citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-12 p40 e assim estimular a resposta imune adaptativa do tipo Th1, sendo esse processo mais evidente com o desafio com a cepa menos virulenta. Estudos em modelos experimentais de paracoccidiodomicose mostram que DCs de

animais susceptíveis à infecção apresentam uma baixa capacidade de induzir uma resposta do tipo Th1 (Almeida & Lopes, 2001).

No estudo da relação células dendríticas/microrganismos deve ser enfatizado que as funções dessas células são dependentes de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), principalmente os receptores do tipo toll-like (TLRs), e do tipo lectina. Assim, esses receptores podem desencadear eventos sinalizadores importantes que modulam a produção de citocinas, fagocitose, rota intracelular do antígeno, indução do metabolismo oxidativo, maturação das células dendríticas e subsequente desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Van Kooyk, 2008; Geijtenbeek&Gringhuis, 2009; Watts *et al*, 2010; Zanoni&Granucci, 2010). Neste contexto, os estudos têm mostrado cada vez mais que as DCs podem induzir respostas imunes adaptativas polarizadas na dependência do tipo de PRR que um determinado patógeno se ligar (Van Vliet *et al*, 2007; Van Vliet *et al*, 2008). Um estudo mostrou que a interação de *P. brasiliensis* com DCs pulmonares de animais suscetíveis à infecção induz aumento da expressão de TLR2 e dectina-1 e produção de altos níveis de IL-10, e baixos de IL-12 por essas células. Ao contrário, em animais resistentes, foi detectada uma baixa expressão de TLR2 associada a níveis baixos de IL-10 mostrando que a ligação do fungo ao TLR2 promove um direcionamento via célula dendrítica para uma resposta não protetora (Ferreira *et al*, 2007). Os trabalhos citados referem-se ao papel primário atribuído às DCs, após o encontro com um determinado patógeno, que é a indução/instrução da resposta imune específica. No entanto, de forma similar às outras células fagocitárias, as DCs têm potencial de secretar moléculas citotóxicas fazendo com que essas células possam potencialmente atuar no controle da replicação dos microrganismos (Serbina *et al*, 2003, Aline *et al*, 2002, Rescigno *et al*, 2002). Vulcano *et al* (2004), mostrou que DCs maturadas na presença de agonistas de vários TLRs liberam radicais livres do oxigênio através da ativação do sistema NADPoxidase e têm capacidade de destruir microrganismos. Assim, essas células poderiam ter um importante papel efetor tanto durante a resposta imune inata como na adaptativa, como já tradicionalmente considerado para outras células fagocitárias como os macrófagos.

Estudos têm mostrado que neutrófilos monócitos humanos e macrófagos murinos, exercem atividade fungicida contra o *Paracoccidioides brasiliensis*

principalmente após a ativação com citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15. Esse processo envolve ativação do sistema NADPoxidase, liberação de metabólitos do O₂, particularmente a H₂O₂ que é a principal molécula efetora contra o fungo (Calvi *et al*, 2003 a e b; Carmo *et al*, 2006; Rodrigues *et al*, 2007; Moreira *et al*, 2008a; Tavian *et al*, 2008). No entanto, estudos com essa abordagem não tem sido realizados em relação às DCs desafiadas com o fungo. Esses estudos tornam-se importantes uma vez que a maior ou menor capacidade das DCs destruírem os microrganismos pode resultar em diferenças na disseminação dos mesmos durante a migração dessas células da periferia até os órgãos linfóides secundários.

Assim, no presente projeto testamos a capacidade de DCs humanas exercerem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, o efeito de citocinas pro inflamatórias sobre essa atividade, assim como o(s) PRR(s) envolvidos.

2. Objetivos

- 1- Avaliar se DCs exercem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* e se esse processo envolve a ativação do sistema NADPoxidase nessas células.
- 2- Avaliar a participação de diferentes PRRs expressos pelas DCs, na possível atividade fungicida exercida por essas células.
- 3- Avaliar o efeito da pré-incubação das células com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre essa atividade.

3. Materiais e Métodos

3.1. Geração de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, USA) com centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos. O anel rico em células mononucleares foi coletado e tratado com tampão de lise para hemáceas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi lavada 2 vezes com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) por 10 minutos a 1500 rpm, para total remoção das plaquetas. Em seguida, a suspensão foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina. A contagem, identificação e a viabilidade das células mononucleares foram realizadas por meio da coloração com Azul Tripán (alíquotas de 50 µL da suspensão celular serão incubadas com 50 µL da solução do corante a 0,02%). A concentração foi ajustada para 5.106 células/mL com posterior plaqueamento de 2mL da suspensão em placas de macrocultura com 6 orifícios. Após o plaqueamento, as culturas celulares foram incubadas por 2 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ para aderência dos monócitos. Após esse período, as células não aderentes foram removidas por meio da lavagem das placas com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Em seguida, as culturas de monócitos foram submetidas ao tratamento com 4mL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal inativado (meio de cultura completo) acrescido de IL-4 recombinante humana (80 ng/mL) e GM-CSF recombinante humano (80 ng/mL). Após 7 dias de cultivo, as células frouxamente aderidas foram recolhidas com auxílio de uma pipeta, lavadas com meio completo e a concentração celular ajustada para 1.106 DCs/mL e plaqueada em placas de 96 orifícios (100µl/orifício) para a realização dos ensaios propostos. Foi realizada a fenotipagem das células para confirmação da diferenciação das DCs, analisando-se a expressão dos marcadores CD14-/CD1a+/CD83-, característicos de DC imatura.

3.2. Imunofenotipagem das células dendríticas obtidas dos monócitos.

Após o período de 7 dias, as células foram transferidas para tubos Falcon para citômetro (BD - Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 1700 rpm

por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II). Em seguida, foi feita a incubação com anticorpos monoclonais anti-CD14 conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex) (2 µL-400 µg/mL), anti-CD1a conjugado com FITC (Fluorescein) (5 µL-100 µg/mL) e anti-CD83 conjugado com PE (Phycoerythrin) (5 µL-50 µg/mL) durante 30 minutos. Para cada teste foi feito um tubo controle no qual as DCs foram incubadas com anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. Após o período de incubação com os respectivos anticorpos, as células foram centrifugadas a 1700 rpm por 10 minutos para lavagem, ressuspensas em 450 µL de ISOTON II, fixadas com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD-Becton, Dickinson and Company) e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD-Becton, Dickinson and Company), usando programa CellQuest.

3.3. Cultivo do fungo

Foram utilizadas as cepas 18 e 265 de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) mantidas em nosso laboratório por meio de cultivo em meio GPY, (2% glicose, 1% peptona e 0,5% extrato de levedura) a 37°C, em tubos de 20 x 20 mm, com subcultivos semanais. As culturas foram usadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

3.4. Obtenção da suspensão de *P. brasiliensis* e teste de viabilidade

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas de acordo com o item anterior. Após o crescimento, essas células foram coletadas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis com pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37°C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que apresentaram-se com aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. Foram utilizadas as suspensões que apresentarem pelo menos 95% de viabilidade.

3.5. Avaliação da recuperação de fungos viáveis

Nesse ensaio, células dendríticas geradas conforme citado anteriormente, na concentração de 1×10^6 /mL (100 μ L/orifício), foram ativadas ou não com diferentes concentrações de IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF por 18 horas e desafiadas durante 4h e 24h com Pb18 ou Pb265 nas concentrações de 2×10^5 leveduras/mL de meio de cultura completo, estabelecendo uma relação DCs:leveduras de 5:1 e avaliadas quanto a porcentagem de recuperação de fungos viáveis. Em alguns ensaios, antes do desafio com o fungo, as células foram tratadas por 2 horas com anticorpos monoclonais anti-TLR2, anti-receptor de manose, anti-Dectina-1 ou anti-DC-SIGN para a avaliação do papel de cada receptor na recuperação fúngica. Usamos uma estratégia experimental, na qual em casa análise, três dos quatro receptores foram bloqueados, deixando apenas um deles disponível. Após os períodos de 4 e 24 horas de desafio com as suspensões do fungo diluídas em meio completo, as células foram coletadas e os orifícios da placa foram lavados diversas vezes com água destilada estéril gelada. Este processo permitiu que as células dendríticas fossem removidas e lisadas, com consequente liberação de fungos que foram fagocitados. As suspensões obtidas foram consideradas culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado em culturas contendo apenas as suspensões fúngicas que foram consideradas culturas controle. Ao final do processo de lavagem, o material obtido resultou em volume final de 2mL. Estas suspensões foram agitadas para homogeneização seguida pelo plaqueamento (100 μ L/placa) em triplicatas em placas de petri descartáveis contendo meio de cultura BHI-ágar (OXOID, LTD, England), na concentração de 47g/L, acrescido de 4% de soro de cavalo, 50 μ g/mL de gentamicina e 5% de fator de crescimento (extrato aquoso). O extrato aquoso foi preparado segundo o método de Kurita *et al.*, 1993, a partir de filtrado de culturas leveduriformes do fungo (cepa 192), cultivadas em meio GPY a 37°C e com agitação de 120 RPM durante 7 dias. Após 8 dias de cultura em estufa BOD, a 36°C, as unidades formadoras de colônias contidas nas placas foram contadas e a% de recuperação de fungos viáveis calculada através da seguinte fórmula :

Média das UFC das culturas experimentais/Média das UFC das culturas controles x

3.6. Avaliação da produção de H₂O₂

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick&Keisari (1980), e adaptado por Pick&Mizel (1981). Para esse ensaio, as células dendríticas geradas conforme citado anteriormente, na concentração de 1x10⁶/mL (100µL/orifício foram incubadas com PMA (10µg/mL) duas horas antes dos períodos a serem avaliados, ou desafiadas com as suspensões dos fungos diluídas em solução vermelho fenol contendo 140mM de NaCl; 10mM de tampão fosfato pH 7; 5,5mM de dextrose; 0,56mM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma ChemicalCo, ST Louis, MO, USA) por 4 e 24 horas ou ainda ativadas com as 3 citocinas por 18 horas em diferentes concentrações e desafiadas com a suspensão fúngica diluída nas condições citadas acima por 4 e 24 horas. Após os períodos de incubação ou desafio com o fungo, a reação foi interrompida pela adição de 0,01 ml de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620nm, contra um blank constituído de solução vermelho fenol e NaOH a 1N. Os resultados da dosagem de H₂O₂ foram expressos em nanomoles de H₂O₂/1x10⁵ células, a partir de curva-padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho fenol. Em nossas condições experimentais a curva foi realizada com concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, e 8.0 nM de H₂O₂.

4. Síntese dos resultados obtidos e alterações no delineamento experimental

A partir da confirmação por imunofenotipagem da obtenção de DCs imaturas, iniciamos o desenvolvimento do projeto avaliando se DCs não ativadas apresentam atividade fungicida contra o fungo. Detectamos que essas células não desenvolvem essa atividade, ao contrário, permitem o crescimento do fungo no seu interior, principalmente quando desafiadas com a Pb18 e no período de 4 horas. No período de 24 horas de desafio, as DCs não exerceram nenhum efeito significativo sobre a Pb18 e Pb265, embora no caso dessa última tenha sido detectado um pequeno crescimento dos fungos. Os nossos próximos experimentos foram realizados com objetivo de avaliar se após ativação com citocinas, essas células adquirem capacidade de destruir o fungo. No entanto, após esse processo, detectamos apenas uma diminuição do crescimento do fungo no interior dessas células, nos ensaios de 4 horas. No período de 24 horas, ao contrário, as citocinas induziram um aumento na recuperação de fungos no interior das células. Assim, como em nenhum dos nossos ensaios detectamos atividade fungicida e sim crescimento do fungo, os resultados serão mostrados em porcentagem de recuperação de fungos viáveis. A incapacidade das DCs exercerem atividade fungicida foi confirmada pelos resultados de produção de H_2O_2 . Os níveis desse metabólito sempre foram muito baixos, mesmo após a ativação com citocinas. Assim, os experimentos previstos usando catalase, para demonstrar o papel desse metabólito na atividade fungicida, não foram realizados. Ainda em função da ausência de atividade fungicida, os experimentos sobre o papel dos PRRS foram realizados no sentido de avaliar a sua participação no processo de crescimento do fungo no interior das células dendríticas.

5. Resultados

A figura 1 mostra os resultados relativos à percentagem de recuperação de fungos viáveis a partir de DCs não ativadas e desafiadas com as duas cepas do fungo. Observamos que as células desafiadas com Pb18 apresentaram altas percentagens de recuperação de fungos viáveis que diminuíram de forma significativa após 24 horas. Em relação à Pb265, detectamos uma baixa recuperação que não foi alterada após 24 horas. Os resultados deixam claro uma maior capacidade da Pb18 crescer no interior das DCs, quando comparada à cepa menos virulenta e que esse processo ocorre de uma forma bastante clara durante o período de 4 horas de desafio com o fungo, uma vez que após 24 horas as percentagens de recuperação foram igualmente baixas para as duas cepas.

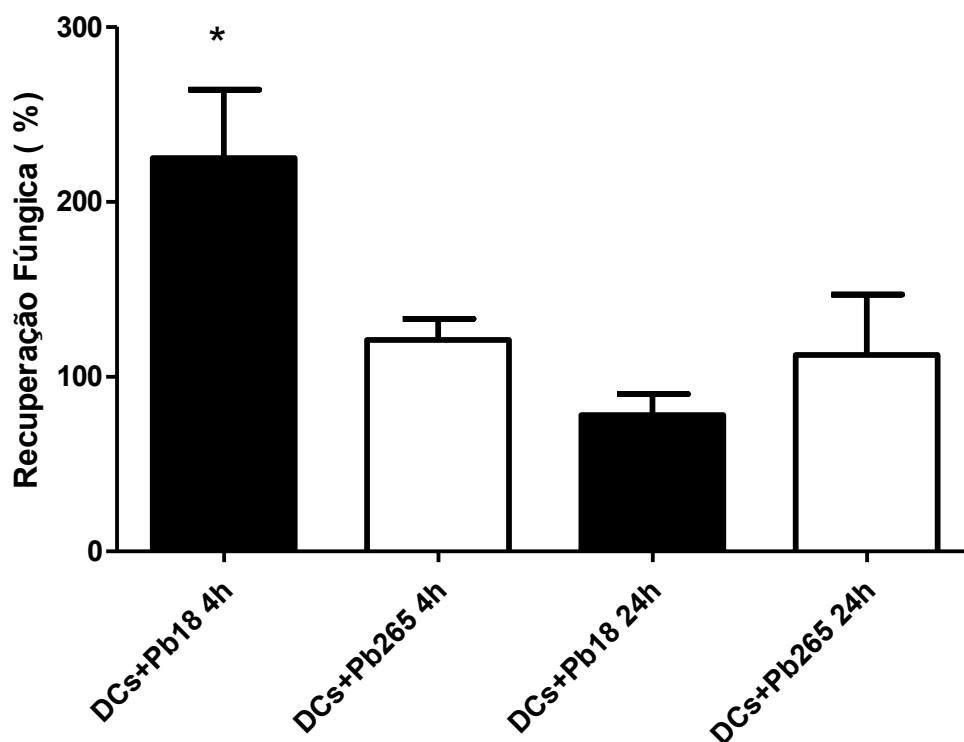
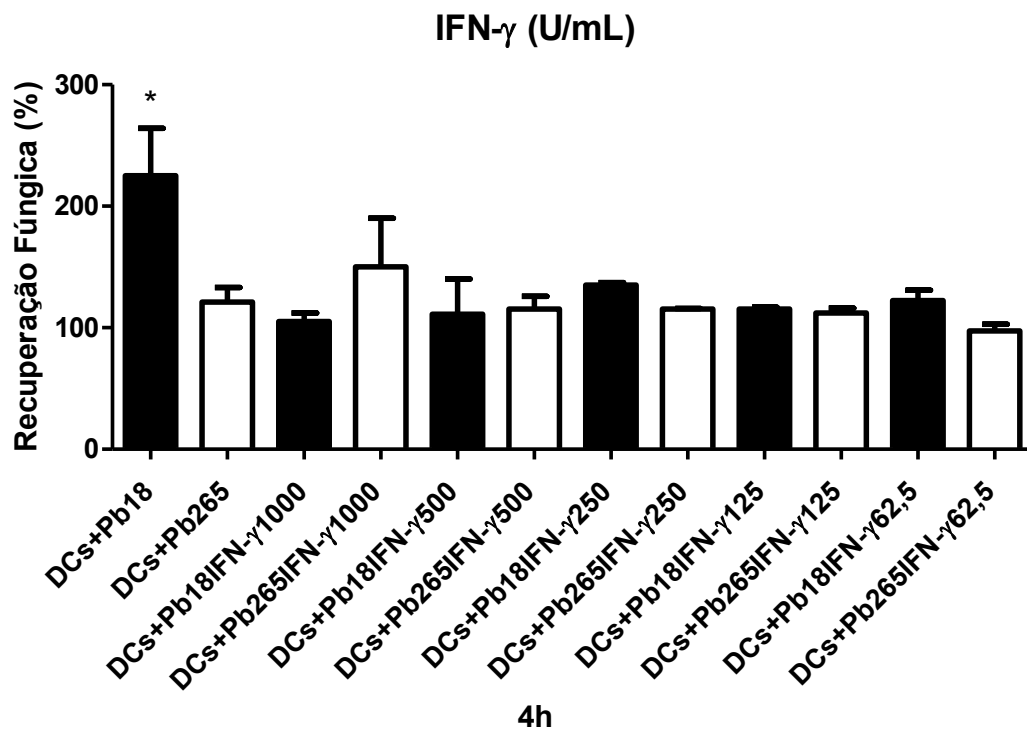


Figura 1: Recuperação de fungos viáveis em DCs não ativadas e desafiadas com Pb18 e Pb265 por 4 e 24 horas. * $p < 0.05$ x Pb18 24 h e Pb265 4 e 24 h (n= 4 indivíduos)

Nas figuras 2, 3 e 4 são mostrados os resultados obtidos com DCs ativadas com as citocinas IFN- γ , GM-CSF e TNF- α respectivamente, e desafiadas com Pb18

e Pb265 por 4h (A) e 24h (B). Detectamos que mesmo após a ativação com IFN- γ , as células não desenvolvem atividade fungicida. No entanto, nas DCs ativadas e desafiadas com a Pb18 por 4 horas, o crescimento do fungo foi significativamente menor quando comparado ao das não ativadas. Em relação à Pb265 não foram detectadas diferenças importantes entre as células ativadas e não ativadas. Resultados diferentes foram detectados no período de 24h. Nesse período, como já mostrado, as DCs não ativadas não mais induzem o crescimento das duas cepas do fungo. No entanto, um significativo crescimento do fungo é detectado após a ativação, principalmente em relação à Pb18. O mesmo perfil de resposta foi obtido com as DCs ativadas com TNF- α e GM-CSF.

(A)



(B)

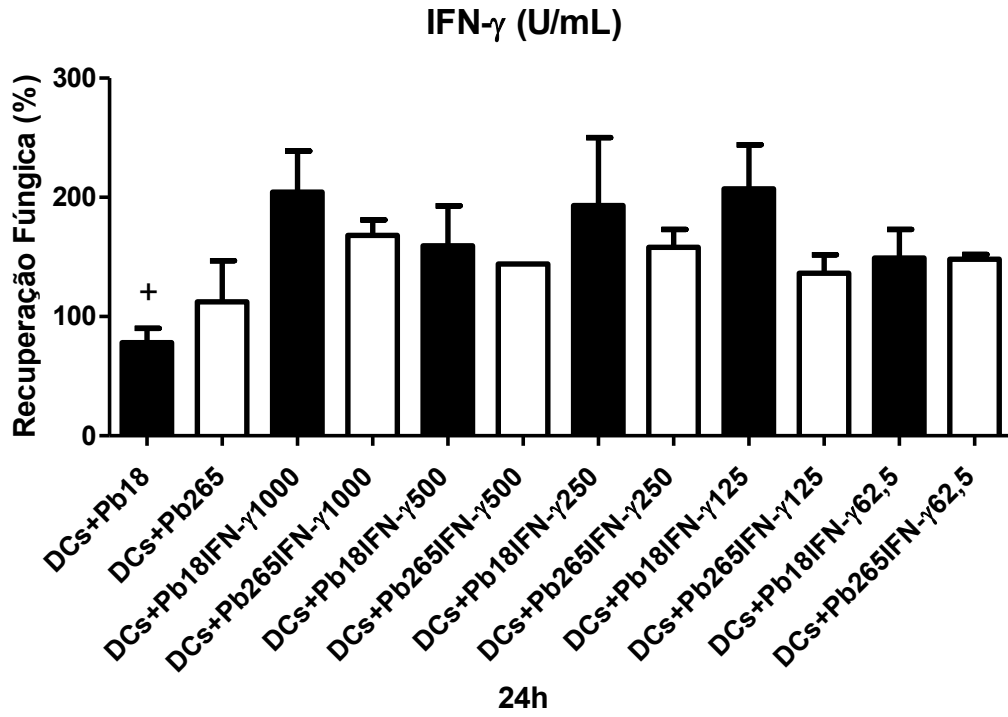
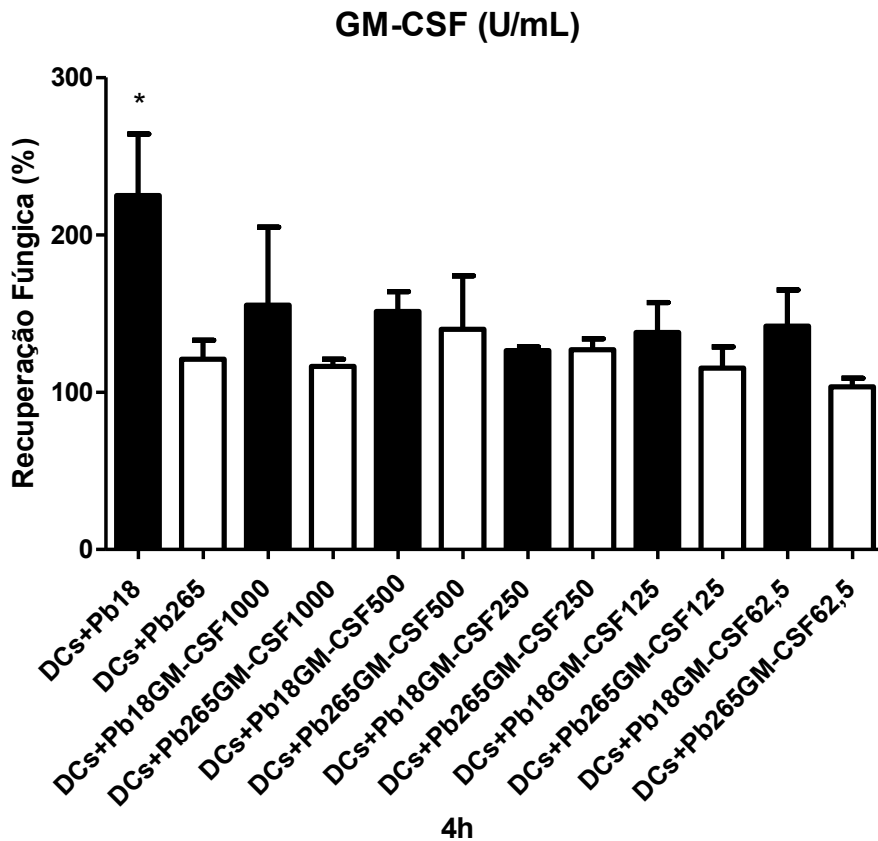


Figura 2: Recuperação de fungos viáveis em DCs não ativadas ou ativadas com IFN- γ por 18 horas e desafiadas com Pb18 ou Pb265 por 4 (A) e 24 horas (B). * $p < 0.05$ x Pb18+IFN- γ todas as concentrações e x Pb265, + $p < 0.05$ x Pb18 + IFN- γ 1000, 250 e 125 (n=4 indivíduos)

(A)



(B)

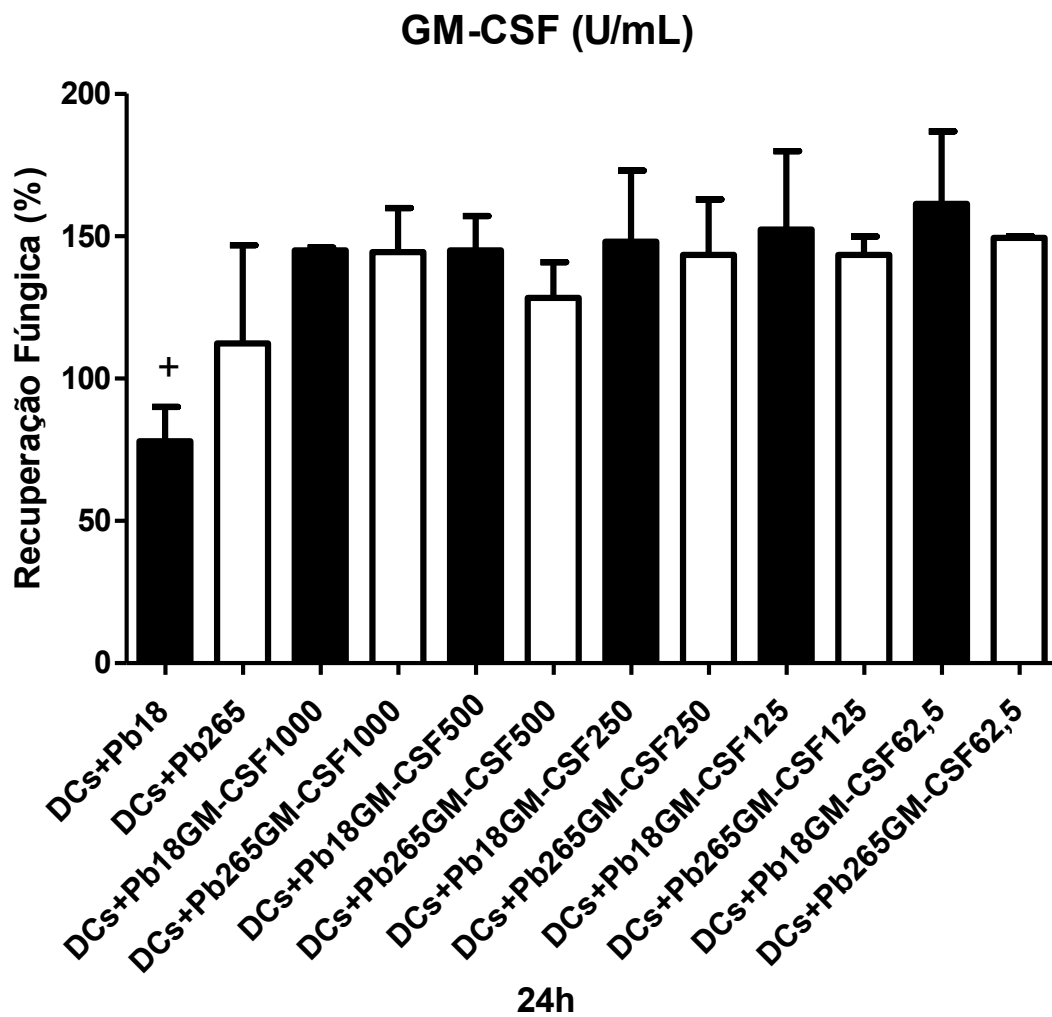
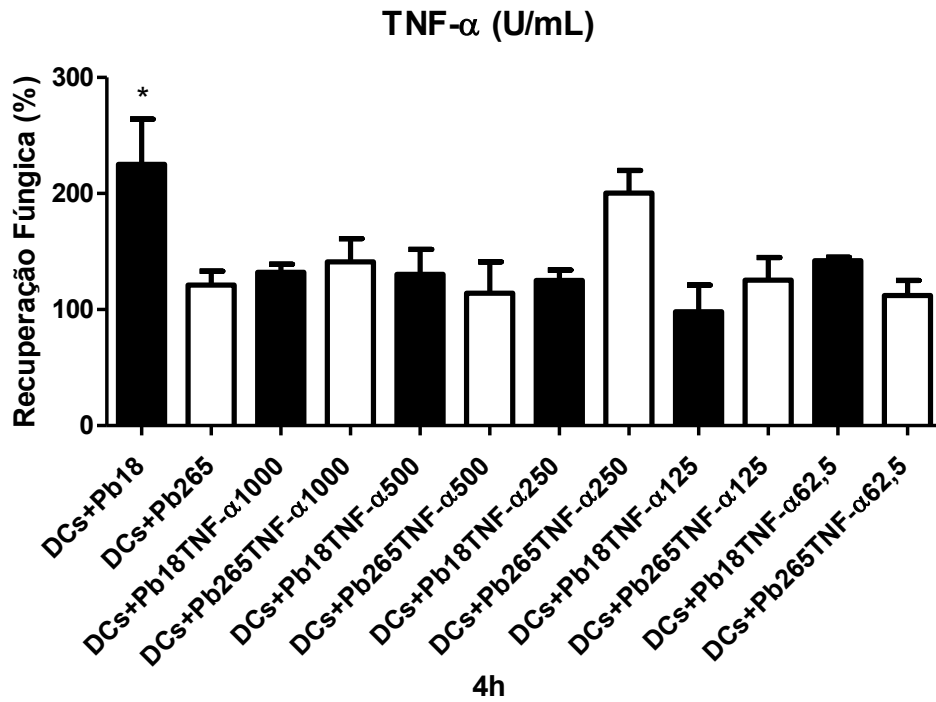


Figura 3: Recuperação de fungos viáveis em DCs não ativadas ou ativadas com GM-CSF por 18 horas e desafiadas com Pb18 ou PB265 por 4 (A) e 24 horas (B). * $p < 0.05$ x Pb18+GM-CSF todas as concentrações e x Pb265, + $p < 0.05$ x Pb18 + GM-CSF todas as concentrações. ($n=4$ indivíduos)

(A)



(B)

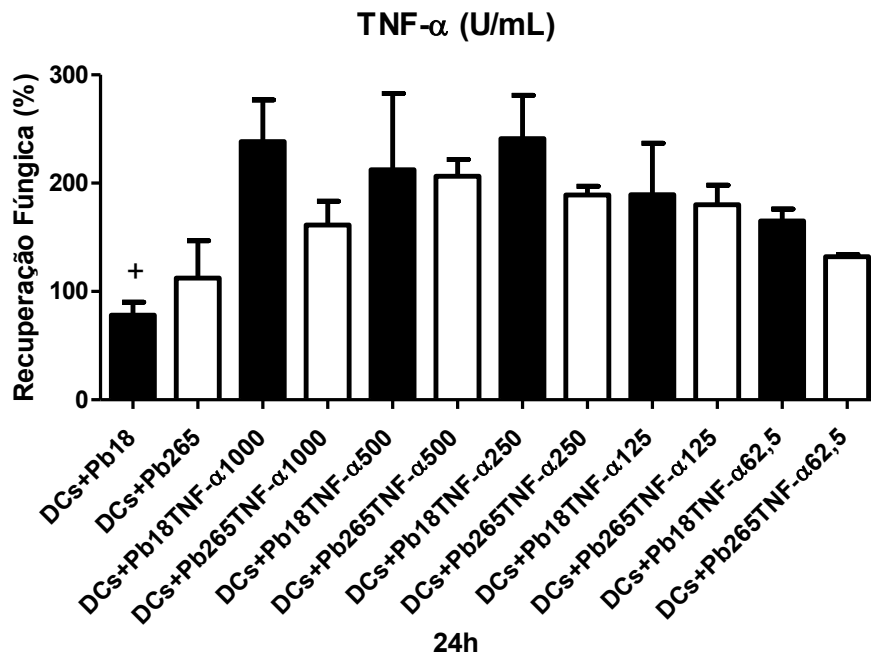
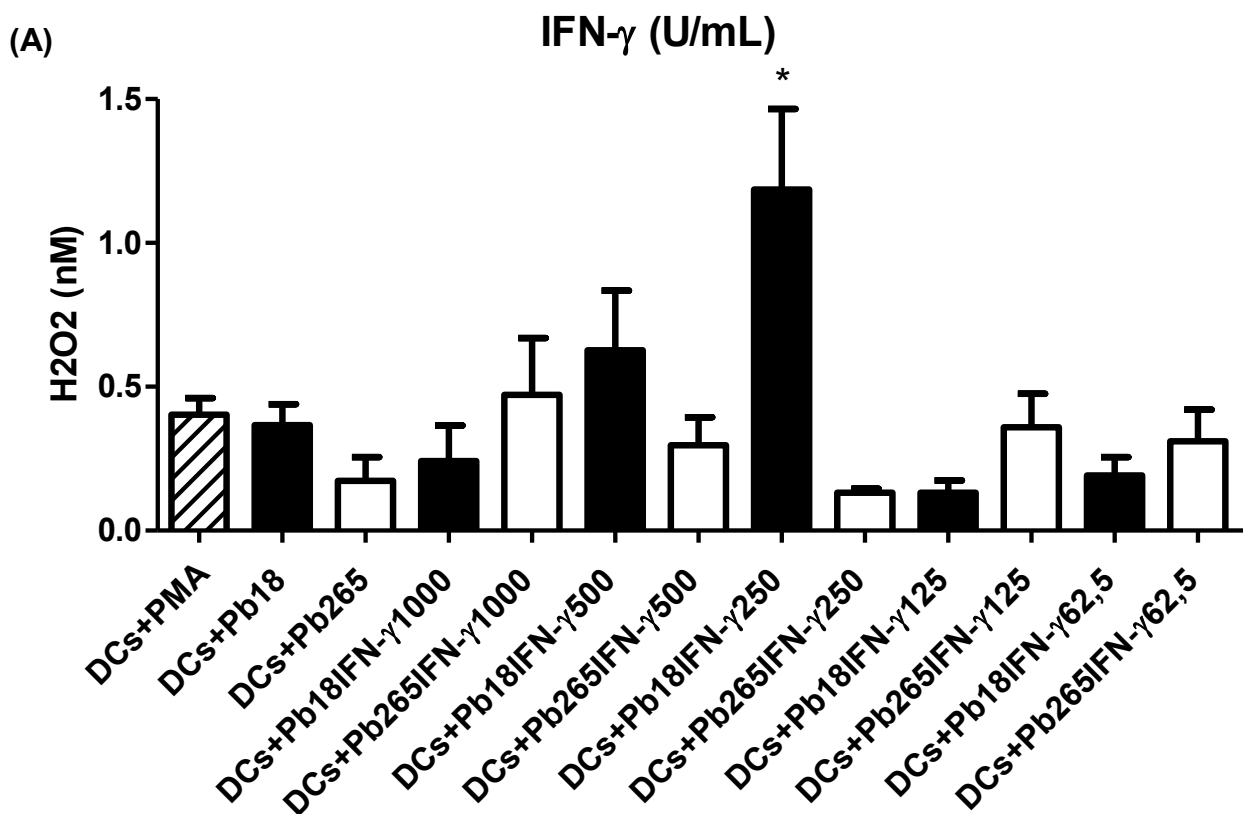
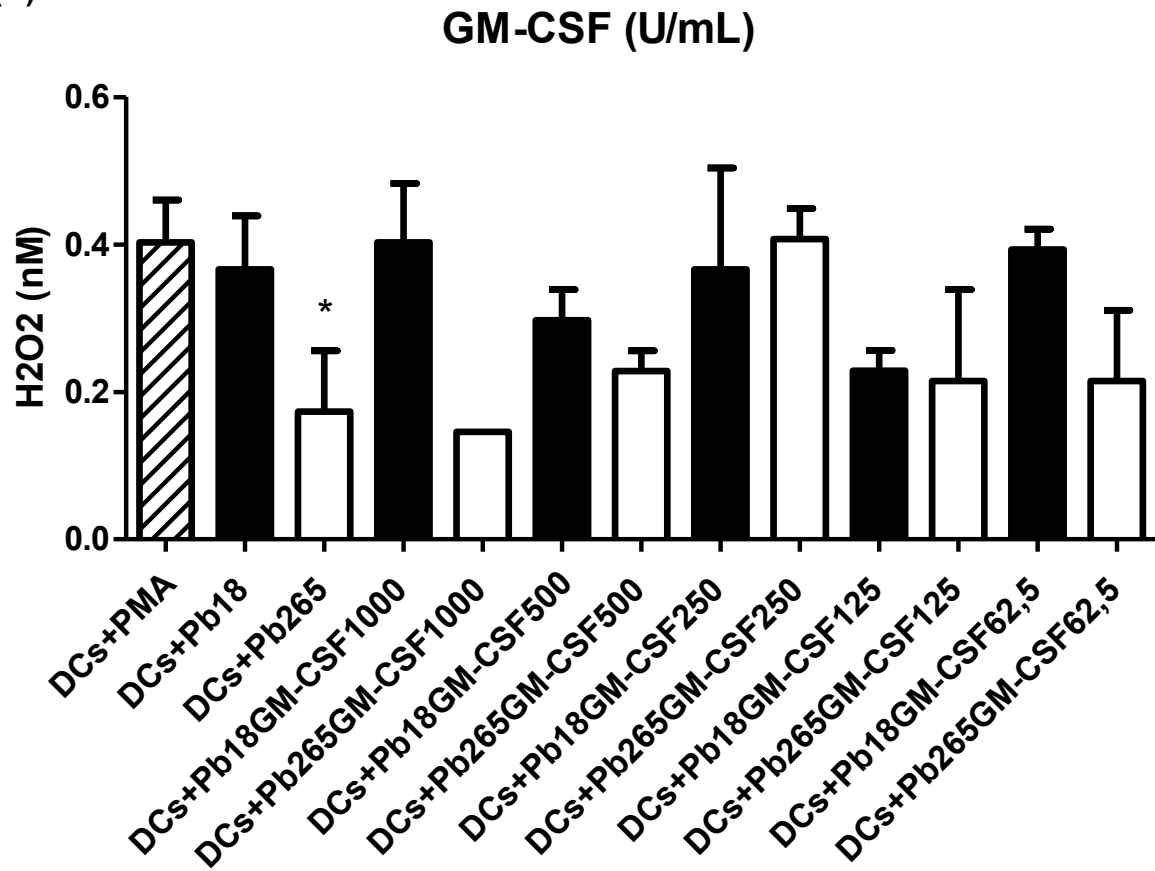


Figura 4: Recuperação de fungos viáveis em DCs não ativadas ou ativadas com TNF- α por 18 horas e desafiadas com Pb18 ou PB265 por 4 (A) e 24 horas (B). * $p < 0.05$ x Pb18+TNF- α todas as concentrações e x Pb265, + $p < 0.05$ x Pb18 + TNF- α todas as concentrações, exceto 62,5. (n= 4 indivíduos)

Após detectarmos que as DCs não desenvolvem atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, avaliamos a capacidade dessas células produzirem H_2O_2 (Figura 5). No período de 4 horas, detectamos níveis baixos do metabólito mesmo em resposta ao PMA, considerado como um indutor ou controle positivo da produção de H_2O_2 . Esses níveis foram ainda levemente mais baixos após o desafio com Pb18 e principalmente com a Pb265. Chama ainda a atenção que após a ativação com as 3 citocinas, esses níveis permaneceram semelhantes ou tenderam a diminuir - Figura 5 A ($IFN-\gamma$), B (GM-CSF) e C ($TNF-\alpha$). No período de 24 horas, não detectamos produção do metabólito em todos os ensaios realizados.



(B)



(C)

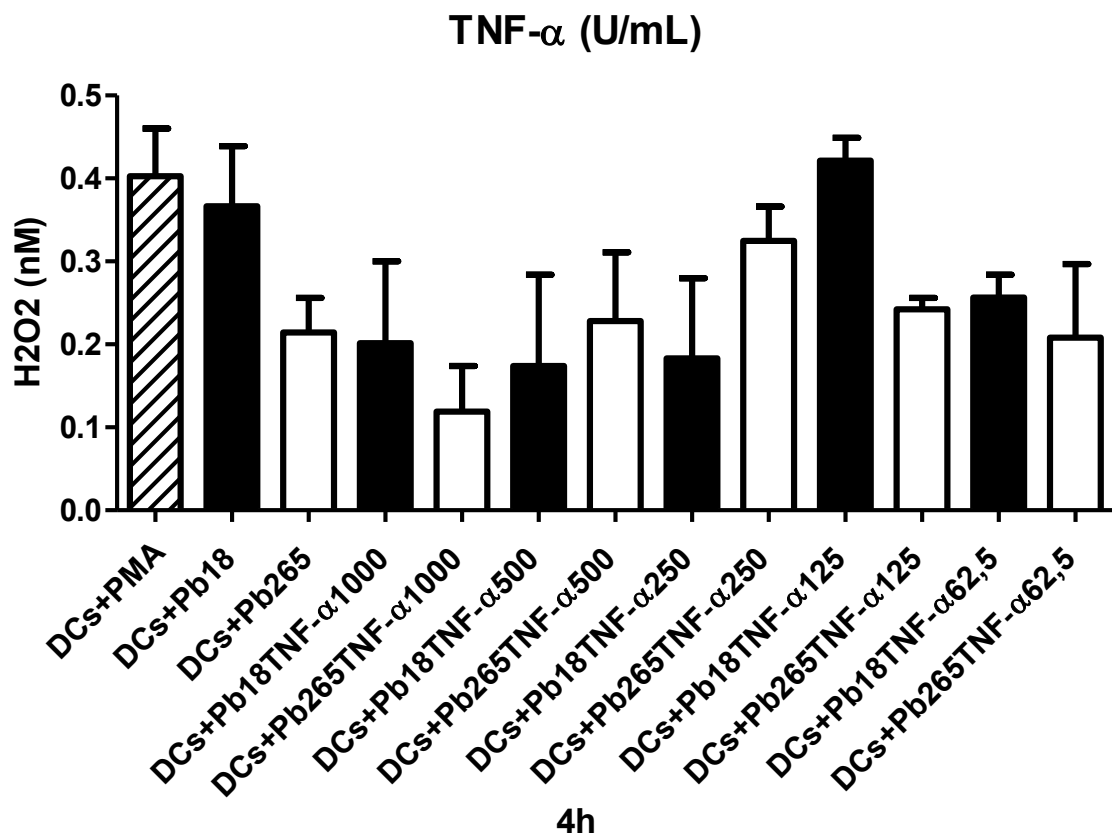
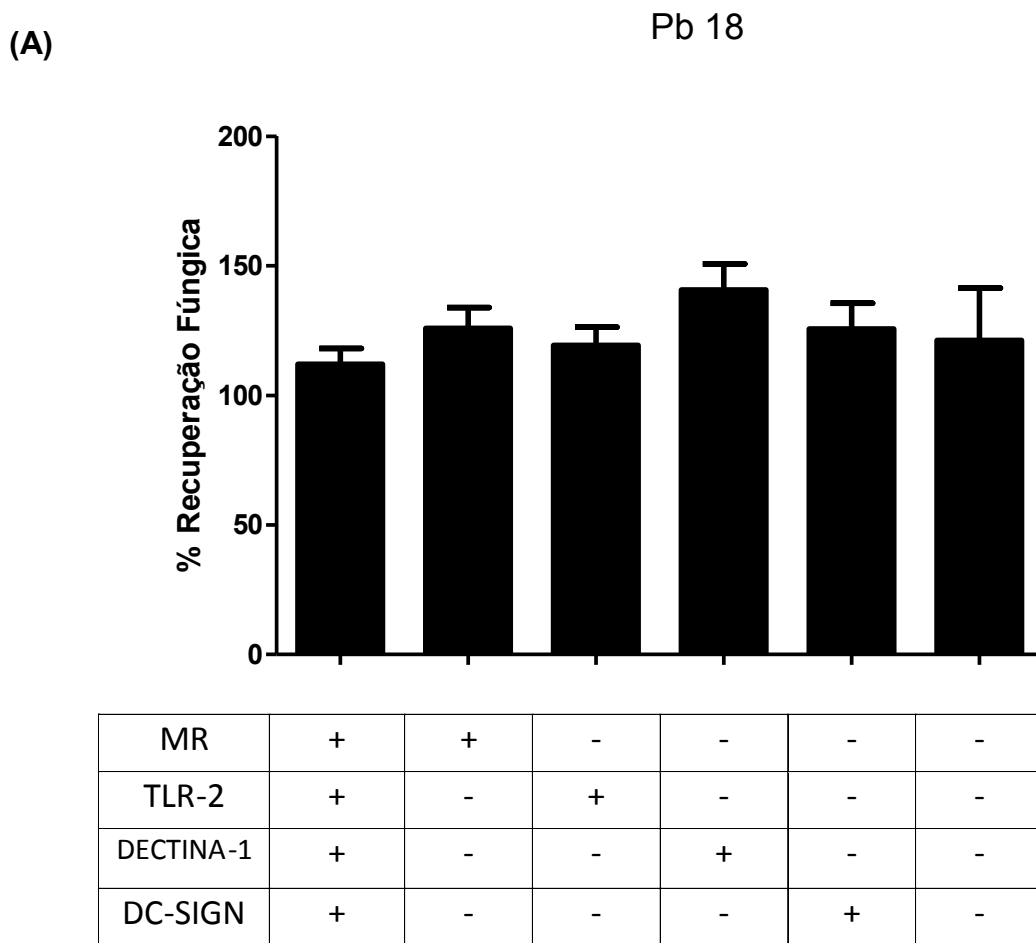


Figura 5. Produção de H₂O₂ por DCs incubadas com PMA ou desafiadas com Pb18 e 265 por 4 h ou ativadas com IFN- γ (A) ou GM-CSF (B) ou TNF- α (C) por 18 horas e desafiadas com Pb18 e Pb265 por 4 horas . * p< 0.05 x DCs+ Pb18 (n=4 indivíduos)

Na figura 6 são mostrados os resultados relativos ao envolvimento dos receptores MR, TLR2 , dectina-1 e DC-SIGN no crescimento do fungo no interior das DCs. Observamos que quando cada um dos receptores ficou disponível e os demais bloqueados, a recuperação de fungos foi semelhante à detectada nas culturas sem nenhum bloqueio. Os resultados de recuperação de fungos viáveis quando somente o dectina-1 ficou disponível foram maiores em relação aos detectados quando cada um dos outros receptores ficou livre. Além disso, quando todas as vias foram bloqueadas, não houve queda significativa da porcentagem de recuperação fúngica nas DCs.



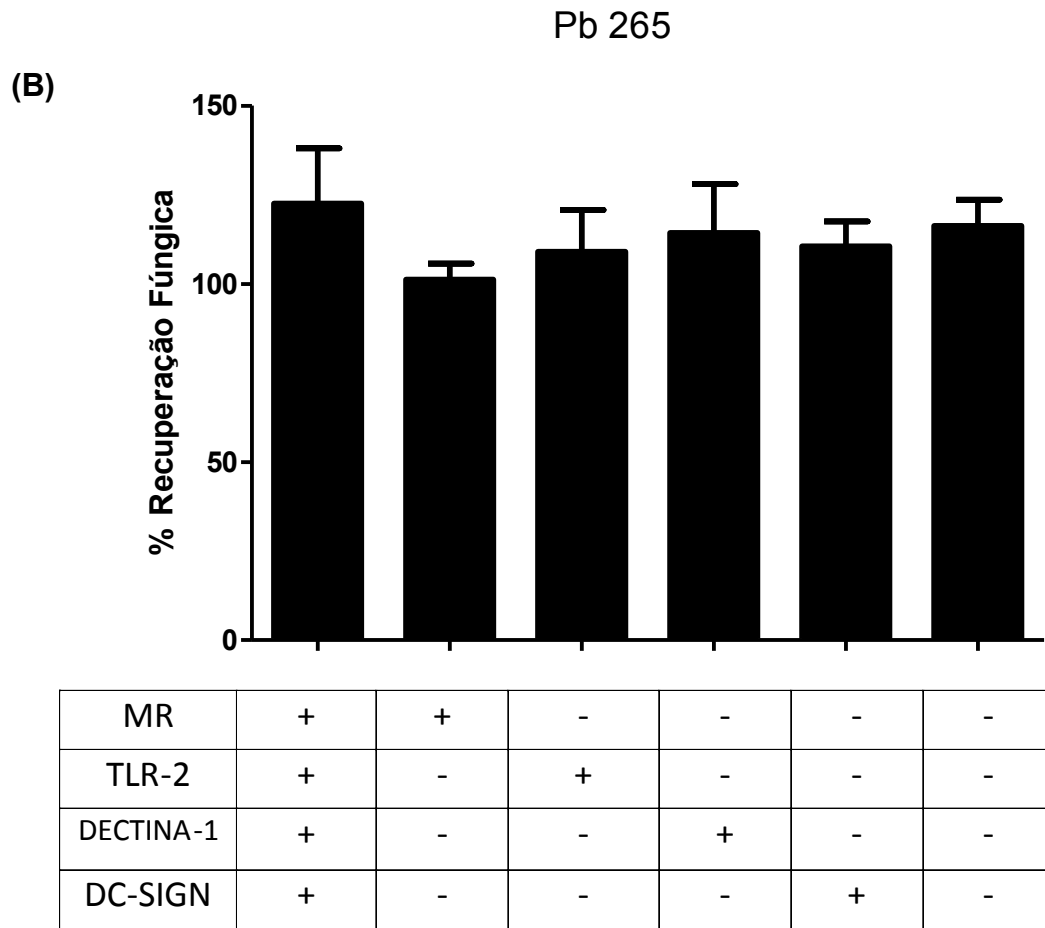


Figura 6. Envolvimento de MR, TLR2, dectina-1 e DC-SIGN no crescimento do *P.brasiliensis* no interior das DCs. DCs foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 e ou anti-MR, anti-Dectina-1 e anti-DC-SIGN por 2 horas, desafiadas com Pb 18 (A) e Pb 265 (B) por 4 horas e avaliadas quanto a recuperação de fungos viáveis. + receptor disponível

6. Discussão

O principal objetivo do presente projeto foi avaliar se células dendríticas desenvolvem atividade fungicida contra cepas mais ou menos virulentas do *P. brasiliensis*. Detectamos de uma forma clara que independente da cepa do fungo, essas células não desenvolvem essa atividade. Ao contrário, permitem o crescimento desses microrganismos no seu interior quando o desafio ocorre por um período de 4 horas. Quando essas células são ativadas detectamos uma nítida inibição desse crescimento, sem, no entanto, ocorrer atividade fungicida. Após 24 horas, esse crescimento não é mais detectado, quando as células não são ativadas, mas ocorre de uma forma clara quando as mesmas são ativadas pelas diferentes citocinas. A capacidade de sobreviver e replicar dentro das DCs, com importantes consequências para as funções dessas células tem sido relatada para outros microrganismos, bem como *Salmonella entérica* sorotipo Typhimurium (Portillo *et al*, 2000) e *Trypanosoma cruzi* (Overtvelt *et al*, 1999).

A incapacidade das DCs de desenvolverem atividade fungicida mostrou-se coerente quando analisamos os nossos resultados de produção de H₂O₂ que é considerado o principal metabólito envolvido na destruição do fungo por células fagocíticas humanas (Calvi *et al*, 2003 a e b; Carmo *et al*, 2006; Rodrigues *et al*, 2007; Tavian *et al*, 2008) e cujos níveis foram sempre muito baixos. Assim, estamos considerando que, diferente do detectado para outras células como monócitos e neutrófilos, o *P. brasiliensis* não consegue ativar de forma adequada a atividade NADPOxidase das DCs, mesmo após estas células serem primadas com citocinas. Estudos mostraram uma resposta semelhante, em relação à *Candida albicans*. Esse fungo não estimula a atividade da enzima NADPOxidase e consequentemente as DCs não exercem atividade fungicida contra esse microrganismo. Os autores consideraram que a *Candida* escapa da morte oxidativa por inibir a atividade da enzima e/ou por ligar-se a PRRS na superfície das células que não estão envolvidos nessa ativação (Donini *et al*, 2007).

Diferenças importantes em relação ao crescimento do fungo foram detectadas no período de 4 e 24 horas de desafio e em relação ao processo de ativação com citocinas. Esse resultado deve ser mais bem investigado; no entanto, alguns mecanismos podem ser sugeridos. Quando o desafio ocorre por um período de 4 horas, por um mecanismo a ser investigado, as células permitem o crescimento do

fungo. Porém, quando essas são tratadas com as 3 citocinas de modo independente são emitidos sinais de ativação para essas células fazendo com que esse crescimento seja inibido. Após 24 horas, não detectamos mais esse crescimento do fungo nas DCs. Sugere-se que as células não suportem mais o crescimento do fungo nesse período, pois entrariam em um processo de apoptose e os fungos começariam a morrer. Nesta fase, o processo de ativação com citocinas atuaria no sentido de ativar essas células a novamente permitir o crescimento do fungo.

Independente dos mecanismos que estamos sugerindo e que devem ser testados, o achado de que o fungo não é destruído pelas DCs pode ter importantes implicações para a atividade dessas células durante a infecção pelo fungo. Estudos com o fungo *C. neoformans*, mostraram que, após fagocitados pelas DCs, os fungos são encontrados dentro do fagolisossomo onde são destruídos pelos componentes lisossomais e processados para a apresentação de antígeno. Após esse processo, uma maturação das DCs é evidente através de um aumento da expressão de moléculas MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias como a CD80 e CD86 (Hole *et al*, 2012). Assim, a destruição do fungo parece ser extremamente vantajosa no sentido de ocorrer uma maturação adequada das DCs e conseqüente melhor apresentação de antígenos por essas células. Nesse sentido, os nossos resultados sugerem fortemente que as DCs, durante a infecção pelo fungo, apresentem defeitos no processo de apresentação de antígeno e, conseqüentemente, sejam ineficazes na indução de uma resposta imune adaptativa. Essas células, deixando de processar o fungo e passando a transportá-lo para os órgãos linfóides secundários, agem como “cavalos de Tróia”, influenciando sobremaneira a patogênese da doença (Santos *et al*, 2011). Nesse sentido, Overtvelt *et al* (1999) mostrou que o *T. cruzi* por sobreviver e replicar dentro das DCs, gera conseqüências importantes para a maturação destas células, levando a uma inibição da produção de IL-12 e TNF- α e da expressão de moléculas de superfície tais como HLA-DR, moléculas coestimulatórias e de adesão. Somado a isso, estudos mostram que quando há um bloqueio da produção de espécies reativas de oxigênio, há também bloqueio da interação entre DCs e linfócitos T (Lahiri, 2010), o que conseqüentemente favorece o sucesso da infecção sistêmica. Rutault *et al* (1998) mostraram que H₂O₂ induz uma resposta similar à induzida por LPS (aumento de moléculas de superfície como MHC-II, CD86 e CD40) em células dendríticas.

Paralelamente, mostraram também, que DCs tratadas com H₂O₂ induziram maior proliferação de linfócitos T quando comparadas ao controle, sugerindo que radicais de oxigênio possuem um importante papel na ativação de DCs para iniciar uma resposta imune adaptativa.

Os resultados relativos à participação de PRRs no crescimento dos fungos nas DCs sugerem que todos os receptores testados podem estar envolvidos no processo, no entanto, com uma participação um pouco maior de Dectina-1 no caso do Pb 18.

Através de sua especificidade para β -glucanas, o receptor Dectina-1 pode reconhecer uma variedade de espécies fúngicas incluindo o *Coccidioides* (Viriyakosol *et al*, 2005), *Saccharomyces* (Brown *et al*, 2003), *Aspergillus* (Hohl *et al*, 2005; Steele *et al*, 2005; Gersuk *et al* 2006), *Pneumocystis* (Steele *et al*, 2003), *Candida* (Brown *et al*, 2003; Netea *et al*, 2006; Gow *et al*, 2007), *Cryptococcus neoformans* (Giles *et al*, 2009) e *P. brasiliensis* (Bonfim *et al*, 2009). Skrzypek *et al* (2009), mostraram pela primeira vez, que o receptor Dectina-1 presente em DCs está envolvido com o reconhecimento, internalização e morte de *C. albicans*. Adicionalmente, Mezgner *et al* (2008) mostraram que o Dectina-1 em células dendríticas imaturas está envolvido com a indução de citocinas pró-inflamatórias em resposta a *Aspergillus fumigatus* e *C. albicans*. Na paracoccidiodomicose pouco se sabe sobre as funções do receptor Dectina-1. Uma avaliação de células dendríticas murinas durante o período inicial de interação celular com o *P. brasiliensis* revelou que 299 genes envolvidos na resposta imune, em transcrição, transdução de sinais e apoptose foram diferencialmente expressos. A análise gênica da expressão do receptor Dectina-1 mostrou que o gene para o receptor foi significativamente induzido, sugerindo que o receptor participa do reconhecimento do *P. brasiliensis* (Tavares *et al*, 2012). Os trabalhos que avaliaram a participação desse receptor nas atividades antifúngicas das células fagocitárias utilizaram diferentes protocolos e os resultados indicam a sua participação no reconhecimento fúngico e na indução da produção de citocinas como TNF- α e outras citocinas (Bonfim *et al*, 2009; Tavares *et al*, 2012; Cestari *et al*, 2013). No entanto, também existem dados indicando a participação do receptor na susceptibilidade ao *P. brasiliensis* (Ferreira *et al*, 2007; González *et al*, 2008). Essa participação pode ser confirmada no presente estudo uma vez que, diferente do detectado para *Candida albicans* (Skrzypek *et al*, 2009), o

receptor dectina-1 aparenta ter um maior envolvimento com o crescimento do fungo no interior das DCs, o que representa um possível mecanismo de escape do *P. brasiliensis* das atividades dessas células. Essa ideia encontra suporte na literatura, uma vez que, em camundongos, esteja bem estabelecido que o receptor de Dectina-1 é um proeminente ativador da fagocitose, do burst respiratório em fagócitos e da produção de mediadores inflamatórios (Brown & Gordon, 2001; Gantner *et al*, 2003; Suran *et al*, 2006; Bauer *et al*, 2008; Dennehy *et al*, 2009; Alvarez *et al*, 2010; Drummond & Brown, 2013), os estudos sobre o papel desse receptor em fagócitos humanos têm apresentado dados conflitantes.

De uma forma global, os resultados permitem concluir que células dendríticas humanas por não produzirem concentrações adequadas de H₂O₂ em resposta ao *P. brasiliensis*, não exercem atividade fungicida contra esse fungo. Ao contrário, permitem o seu crescimento mesmo quando ativadas com GM-CSF, INF- γ ou TNF- α . Além disso, sugerem que todos os PRRs testados como TLR2, Manose e DC-SIGN participam do processo, mas que o receptor Dectina-1 tem um papel mais importante em relação aos outros testados. Estudos posteriores devem ser realizados no sentido de avaliar as consequências do mecanismo descrito nas funções das DCs durante a evolução da doença, como capacidade de maturação, apresentação de antígenos e indução de uma resposta específica.

De acordo com Tavares *et al* (2012), após cultivo de DCs com *P. brasiliensis* por 6 horas, revelou-se que o gene que codifica os receptores DC-SIGN, Fc γ R1 e TLR4 foi menos expresso no início da infecção. Além disso, a partir de qRT-PCR mostrou-se que a expressão dos genes que codificam TLR2, TLR6 e TLR9 parece não sofrer influência do fungo. Neste mesmo estudo, também foram analisados os perfis de expressão de dectina-1 e MR mostrando um aumento na expressão do primeiro receptor citado e diminuição do segundo após 6 horas de infecção.

Apesar de os PRRs testados serem os principais em DCs, podemos afirmar que, possivelmente, há outros receptores envolvidos no crescimento do fungo dentro da célula, já que não houve diferenças significativas entre os testados.

Monócitos tratados com inibidores de MR, TLR1, TLR2, TLR6, CD14, CD11b e CD18 e desafiados com *Penicillium marneffe* mostraram significativa redução do reconhecimento do patógeno, indicando que vários PRRs na superfície dos

monócitos estão envolvidos no reconhecimento inicial de fungos (Srinoulprasert *et al*, 2009), podendo o mesmo ocorrer com DCs.

Estudos comparativos realizados em ratos infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *P. brasiliensis* verificou que ratos deficientes em TLR4 eram mais resistentes à PCM do que os que apresentavam o receptor (Calich *et al*, 1995). Indicando que este receptor pode estar envolvido com o reconhecimento e posterior crescimento do fungo dentro da célula. Além disso, Netea *et al* (2004) mostraram que ratos nocauteados para TLR2 são menos susceptíveis a infecção por *Candida albicans* devido a diminuição da presença de células T regulatórias e a uma maior eficiência da imunidade específica para fungos. Sendo assim, Calich *et al* (2007), verificou que o papel de TLRs na PCM sugere que as leveduras de *P. brasiliensis* utilizam TLR2 e TLR4 para entrar em macrófagos e infectar hospedeiros. Esse estudo mostrou que estes dois receptores aparentemente reconhecem o fungo resultando em um aumento da habilidade de fagocitose, da secreção de NO e da infecção pelo fungo em macrófagos. Apesar de parecerem contraditórios, estes resultados mostram que a atividade de exterminar o fungo, geralmente associada à secreção de NO, não é capaz de reduzir o crescimento do fungo permitido pela presença dos TLRs. Desta maneira, a interação do *P. brasiliensis* com os TLRs em questão pode ser considerada um mecanismo de patogenicidade do fungo, que os utiliza para infectar as células e garantir sua própria multiplicação. O mesmo pode ser pensado no caso de células dendríticas, que podem utilizar, além da dectina-1, TLR4 para a internalização do fungo e conseqüente crescimento deste dentro das células, visto que não há produção de NO pelas mesmas.

Nakaira-Takahagi *et al* (2011) determinou que o antígeno do *P. brasiliensis*, gp43, aumentou a expressão de TLR4 em monócitos após 4 horas de infecção e de TLR2 após 18 horas. No entanto, o mesmo estudo sugeriu que TLR2 e MR são os receptores mais importantes envolvidos na interação de gp43 com monócitos humanos.

O papel de TLR2 e TLR4 no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis* foi estudado também em monócitos e neutrófilos humanos mostrando que a deficiência de TLR2 levou a um aumento do perfil Th17 e a uma diminuição da expansão de células T regulatórias (Loures *et al*, 2009). Além disso, o reconhecimento do fungo por TLR4 também levou a um aumento da produção de

citocinas do perfil de resposta Th17 e a um comprometimento da expansão de Treg, resultando em uma forma de infecção mais severa (Loures *et al*, 2010). No entanto, há poucos estudos que mostram o papel de outros receptores como, por exemplo, TLR9 na infecção de *Pb*. Este PRR, de acordo com Nakamura, 2008; van der Veerdonk, 2008; Ramaprakash, 2009; Ramirez-Ortiz, 2008; Bellocchio, 2004; Mansour, 2012; participa do reconhecimento de outros fungos patogênicos como *A. fumigatus*, *C. albicans* e *C. neoformans*. Isto sugere que este receptor possa ter importante papel na paracoccidiodomicose, visto que o DNA do *P. brasiliensis* apresenta um grande número de ligantes de TLR9 (Souza *et al*, 2001), além de apresentar natureza multinucleada, indicando grande liberação de material genético quando há morte celular devido à infecção (Rutz *et al*, 2004). Além disso, Menino *et al* (2013) mostraram que o DNA purificado de *P. brasiliensis* induziu a secreção de TNF- α e IL-6 por uma via dependente de TLR9 e que, quando este receptor estava bloqueado ou as leveduras tratadas com DNase, houve redução da porcentagem de fagocitose por macrófagos, indicando a necessidade de ativação de TLR9 para que haja total fagocitose do fungo.

Estudos posteriores devem ser realizados no sentido de avaliar outros PRRs que possam estar envolvidos com o crescimento fúngicos dentro das DCs, tais como TLR4 e TLR9, e as devidas consequências deste crescimento sobre a atividade dessas células e conseqüentemente sobre a evolução da doença.

7. Referências Bibliográficas

- Acorci, M. J.; Dias-Melicio, L. A.; Golim, M. A., Bordon-Graciani, A. P.; Peraçoli, M. T. ; Soares, A. M. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol.** 2009, 69:73-9.
- Acorci-Valério, M. J.; Bordon-Graciani, A. P.; Dias-Melicio, L. A.; Golim, M. A.; Nakaira-Takahagi, E.; Soares, A. M. C. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J Immunol.** 2010, 71:99-108.
- 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.
- Almeida, S. R.; Lopes, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz J Med Biol Res.** 2001, 34:529-37.
- Alvarez, Y.; Valera, I.; Municio, C.; Hugo, E.; Padrón, F.; Blanco, L.; Rodríguez, M.; Fenández, N.; Crespo, M.S. Eicosanoides in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. **Mediators Inflamm.** 2010; 2010. Pii: 201929.
- Baida, H.; Biselli, P. J.; Juvenale, M.; Del Negro, G. M.; Mendes-Giannin, M. J.; Duarte A. J.; Benard, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.** 1999, 4:273-8.
- Bauer, S.; Hartmann, G.; Goodridge, H.S.; Underhill, D.M. Fungal recognition by TLR-2 and Dectin-1 in: Toll-like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. **Edited by Hofmanns F. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008:87-109.**
- Bellocchio, S.; Montagnoli, C.; Bozza, S.; Gaziano, R.; Rossi, G.; Mambula, S. S.; Vecchi, A.; Mantovani, A.; Levitz, S. M.; Romani, L. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **J Immunol.** 2004, 172: 3059-3069.
- Benard, G.; Romano, C.; Cacere, C. R.; Juvenale, M.; Mendes-Giannin M. J. S.; Duarte, A. J. S. Imbalance of IL-2, IFN-gama and IL-10 secretion in the Immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine.** 2001, 13:248-252.

- Bernard, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. 2008, 165:209-21. Review.
- Bocca, A. L.; Hayashi, E. E.; Pinheiro, A. G.; Furlanetto, A. B.; Campanelli, A. P.; Cunha, F. Q.; Figueiredo, F. *Treatment of Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J Immunol**. 1998, 161:3056-63.
- Bonfim, C. V.; Mamoni, R. L.; Blotta, M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **MedMycol**. 2009, 47:722-33.
- Brown, G.D.; Herre, J.; Williams, D. L., et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucan. *J Exp Med*. 2003, 197:1119-1124.
- Brown, G.D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu Rev Immunol**. 2011, 29:1-21.
- Brown, G.D.; Gordon, S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. **Nature Immunol**. 2011; 413:36-37.
- Brummer E.; Hanson L. H.; Restrepo A.; Stevens D. A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J Immunol**. 1988a, 140:2786-9.
- Brummer E.; Hanson L. H.; Stevens D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for non oxidative mechanisms. **Int J Immunopharmacol**. 1988b, 10:945-52.
- 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.; Castaneda, E.; Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**. 1993, 6:89-117.
- Burlandi-Soares, L. C.; Mamoni, R. L.; Lyra, L.; Schreiber, A. Z.; Blotta, M. H. Expression of activation and cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes of patients with paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**. 2010, 48:843-52.
- Cacere, C. R.; Mendes-Giannin M. J. S.; Do Valle, A. C.; Duarte, A. J. S.; Benard, G. Altered ex vivo expression of caspase 8, caspase 9, and Bcl-2 is

associated with T-cell hyporeactivity in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin Vaccine Immunol.** 2009, 16:953-5.

- Calich, V. L.; Kipnis, T. L.; Mariano, M.; Neto, C. F.; Silva, W. D. 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.
- Calich, V. L. G.; Singer-Vermes, L. M.; Siqueira A. M.; Burger, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J ExpPathol.** 1985a, 66:585-594.
- Calich V. L.; CoppiVazCa, Burger, E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J ExpPathol.** 1985b, 66:57-65.
- Calich, V. L. G.; Kashino, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis*infection. **Braz J MedBiol Res.** 1998, 31:615-23.
- Calich, V. L. G.; Da Costa, T. A.; Felonato M.; Arruda, C.; Bernardino, S.; Loures, F. V.; Ribeiro, L. R.; Valente-Ferreira, R. C.; 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 ImmunolMed Microbiol.** 2008b, 53:1-7.
- Calvi, S. A.; Peraçoli, M. T. S.; Mendes, R. P.; Marcones-Machado, J.;Fecchio, D.; Marques, S. A. *et al.* 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. J. R.; 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.
- Campanelli, A. P.; Martins, G. A, Souto, J. T.; Pereira, M. S.; Livonesi, M. C.; Martinez, R.; Silva, J. S. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte

antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis.** 2003, 187:1496-505.

- Cano, L. E.; Arango, R.; Salazar, M. E.; Brummer, E.; Stevens, D. A.; Restrepo, A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J Med Vet Mycol.** 1992a, 30:161-8.
- 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.** 1992b, 60: 2096-100.
- Cano, L. E.; Kashino, S. S.; Arruda, C.; André, D.; Xidieh, C. F.; Inger-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.; Singer-Vermes, L. M.; Vaz, C. A.; Russo, M.; Calich, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect Immun.** 1995, 63:1777-83.
- 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.
- Cavassani, K. A.; Campanelli, A. P.; Moreira, A. P.; Vancim, J. O.; Vitali, L. H.; Mamede, R. C.; Martinez, R.; Silva, J. S. 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. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Curr Opin Immunol.** 199, 9:10-6.
- Costa, D. L.; Dias-Melicio, L. A.; Acorci, M. J.; Bordon, A. P.; Taviani, E. G.; Peraçoli, M. T.; Soares, A. M. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol Immunol.** 2007, 51:73-80.
- Cestari, M. B.; Bachiega, T.F.; Fernandes, R.K.; Quaglia e Silva, J. C.; Golim, M.A.; Soares, A.M.V.C.; Dias-Melicio, L.A. IL-18 does not modulate dectin-1 expression on human monocytes challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Immunology.** 2013, 572.

- Dennehy, K.M.; Willment, J.A.; Williams, D.L.; Brown, G. D. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of dectin-1 and TLR signaling pathways. **Eur J Immunol.** 2009, 39:1379-1386.
- Dias-Melicio, L. A.; Fernandes, R. K.; Golim, M. A.; Rodrigues, D. N.; 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.
- Donini, M.; Zenaro, E.; Tamassia, N.; Dusi, Stefano. NADPH oxidase of human dendritic cells: Role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. **Eur J Immunol.** 2007, 37:1194-203.
- Drummond, R.A.; Brown, G.D. Signalling C-type Lectins in Antimicrobial Immunity. **PLoS Pathog.** 2013, 9(7); e1003417.
- Elsen, S.; Doussi re, J.; Viliers, C. L.; Faure, M.; Berthier, R.; Papaioannou, A.; Grandyaux, N.; Marche, P. N.; Vignais, P. V. Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells. **J Cell Sci.** 2004, 117:2215-26
- Ferreira, K. S.; Bastos, K. R.; Russo, M.; Almeida, S. R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **J InfectDis.** 2007, 196:1108-15.
- Ferreira, K. S.; Lopes, J. D.; Almeida, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol Lett.** 2004, 94:107-14.
- Ferreira, M. C.; Oliveira, R. T.; Silva, R. M.; Blotta, M. H.; Mamoni, R. L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.** 2010, 78:4392-401.
- Fornazim, M. C.; Mamoni, R. I.; Spago, M. C.; Oliveira, R. T. D.; Gabetta, C. S.; Nowill, A. E.; Blotta, M. H. S. I. Phenotypic and functional characterization of human dendritic cells induced by low and high-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biom dica Revista Del Instituto Nacional de Salud.** 2008, 28:187.
- 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. **Ver Soc Bras Med Trop.** 1987, 20:129-32.

- Franco, M.; Mendes, R. P.; Moscardi-Bacchi, M.; Reskalla-Iwasso, M. T.; Montenegro, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis.** 1989, 4:185-220.
- Furgier-Vivier, I.; Servet-Delprat, C.; Rivaller, P., Rissoan M. C.; Liu Y. J.; Rabourdin-Combe, C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic cells and T cells. **J Exp Med.** 1997, 186:813-23.
- Gantner, B.N.; SImmons, R.M.; Canavera, S.J.; Akira, S.; Underhill, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and toll-like receptor 2. **J Exp Med.** 2003, 197:1107-1117.
- Geijtenbeek, T. B.; Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nat Ver Immunol.** 2009, 9:465-79. Review.
- González, 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.
- González, A.; Yáñez, A.; Gozalbo, D.; Gil, M.L. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2008, 54(3):365-74.
- Gow, N.A.; Netea, M. G.; Munro, C.A.; Ferwerda, G.; Bates, S.; Mora-Montes, H. M.; Walker, L.; Jansen, T.; Jacobs, L.; Tsoni, V.; Brown, G. D.; Odds, F. C.; Van der Meer, J. W.; Brown, A. J.; Kullberg, B. J. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. **J Infect Dis.** 2007, 196:1565-1571.
- Hohl, T.M.; Van, E.P.P.S.; Rivera, A.; et al. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. **PLoS Pathog.** 2005, 1:e30.
- Jimenez, B. E.; Murphy, J. W. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infect Immun.** 1984, 46:552-8.
- Kashino S. S.; Fazioli, R. A.; Cafalli-Favati, C.; Meloni-Bruneri, L. H.; Vaz, C. A, Burger, E.; Singer, L. M.; Calich V. L. 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.

- Kennedy, A.D.; Willment, J.A.; Dorward, D.W.; Williams, D.L.; Brown, G.D.; Deleo, F.R. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. **Eur J Immunol.** 2007, 37:467-478.
- Kurita, N.; Sano, A.; Coelho, K. I.; 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.
- Kurita, N.; Biswas, S. K.; Oarada, M.; Sano, A.; Nishimura, K.; Miyaji, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** 1999, 37:19-24.
- Kurita N.; Oarada M.; Miyaji M.; Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** 2000; 38: 177-82.
- Kurita, N.; Oarada, M.; Brummer, E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med Mycol.** 2005, 43:417-22.
- Livonesi, M. C.; Souto, J. T.; Campanelli, A. P.; Maffei, C. M.; Martinez, R.; Rossi, M. A.; Da Silva, J. S. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Med Mycol.** 2008, 46:637-46.
- Longhi, L. N.; Silva, R. M.; Fornazim, M. C.; Spago, M. C.; Oliveira, R. T.; Nowill, A. E.; Blotta, M. H.; Mamoni, R. L. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Immunol.** 2012, 189:935-45.
- Loures, F. V.; Pina, A.; Felonato, M.; Araujo, E. F.; Leite, K. R.; Calich, V. L. 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, 78:1078-1088.
- Loures, F.V.; Pina, A.; Felonato, M.; Calich, V. L. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol.** 2009, 183:1279-1290.

- Mamoni, R. L.; Blotta, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**. 2005, 32:20-9.
- Mamoni, R. L.; Blotta, M. H. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**. 2006, 35:207-16.
- Mamoni, R. L.; Nouér, S. A.; Oliveira, S. J.; Musatti, C. C.; Rossi, C. L.; Camargo, Z. P.; Blotta, M. H. 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.
- Mansour, M. K.; Tam, J. M. The cell biology of the innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. **Anm N Y Acad Sci**. 2012, 1273: 78-84.
- Mcewen, J. G.; Bedoya, V.; Patiño, M. M.; Salazar, M. E.; Restrepo, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**. 1987, 25:165-75
- Mello, L. M.; Silva-Vergara, M. L.; Rodrigues, V. Patients active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. **Human Immunology**. 2002, 63:149-154.
- Mendes, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco. M.; Lacaz, C. S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. (Eds). Paracoccidioidomycosis. **Boca Raton. CRC Press**. 1994, p. 233-58.
- Menino, J. L.; Saravia, M.; Gomes-Alves, A. G.; Lobo-Silva, D.; Sturme, M.; Gomes-Rezende, J.; Saraiva, A. L.; Goldman, G. H.; Cunha, C.; Carvalho, A.; Romani, L.; Pedrosa, J.; Castro, A. G.; Rodrigues, F. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. **PLoS Negl Trop Dis**. 2013, 7(7): e2317.
- Moreira, A. P.; Dias-Melicio, L. A.; Peraçoli, M. T.; Calvi, S. A.; Soares, A. M. V. C. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H(2)O(2) and NO effector mechanisms. **Mycopathologia**. 2008a, 166:17-23.
- Moreira, A. P.; Cavassani, K. A.; Tristão, F. S. M.; Campanelli, A. P.; Martinez, R.; Rossi, M. A.; Silva, J. S. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **J Immunol**. 2008b, 180:3049-56.

- Moreira, A. P.; Dias-Melicio, L. A.; Soares, A. M. 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.
- Moscardi-Bacchi, M.; Brummer, E.; Stevens, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol.** 1994, 40:159-64.
- Munk, M. E.; Da Silva, W. D. Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. **J Med Vet Mycol.** 1992, 30:481-4.
- 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.
- Nakamura, K.; Miyazato, A.; Xiao, G.; Hatta, M.; Inden, K.; Aoyagi, T.; Shiratori, K.; Takeda, K.; Akira, S.; Saijo, S.; Iwakura, Y.; Adachi, Y.; Ohno, N.; Suzuki, K.; Fujita, J.; Kaku, M.; Kawakami, K. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. **J Immunol.** 2008, 180:4067-4074.
- Nascimento, F. R.; Calich, V. L.; Rodríguez, D.; Russo, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol.** 2002, 168:4593-600.
- Netea, M. G.; Gow, N.A.R.; Munro, C. A.; Bates, S.; Collins, C.; Ferwerda, G.; Hobson, R. P.; Bertram, G.; Hughes, H.B.; Janset, T. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **J Clin Invest.** 2006, 116:1642-1650.
- Netea, M. G.; Suttmüller, R.; Hermann, C.; Van der Graaf, C. A.; Van der Meer, J. W.; Van Krieken, J. H.; Hartung, T.; Adema, G.; Kullberg, B. J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J Immunol.** 2004, 172: 3712–3718.
- Oliveira, S. J.; Mamoni, R. L.; Musatti, C. C.; Papaiordanou, P. M. O.; Blotta, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of

paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. **Microbes Infected**. 2002, 4:139-44.

- Overtvelt, L. V.; Vanderheyde, N.; Verhasselt, V.; Ismaili, J.; Vos, L.; Goldman, M.; Willems, F.; Vray, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect Immun**. 1999, 4033-4040.
- Peraçoli, M. T.; Parise-Fortes, M.; Silva, M. F. P.; Montenegro, M. R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **RevInstMed Trop**. 1995, 37:129-36.
- Peraçoli, M. T.; Soares, A. M.; Mendes, R. P.; Marques, S. A.; Pereira, P.C.; Rezkallah-Iwasso, M. T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. **J MedVetMycol**. 1991, 29:373-80.
- Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J ImmunolMethods**. 1980, 38:161-70.
- Pick, E.; Keisari, Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages--induction by multiple nonphagocytic stimuli. **CellImmunol**. 1981, 59:301-18
- 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.
- Portillo, F. G.; Jungnitz, H.; Rohde, M.; Guzmán, C. A. Interaction of *Salmonella entérica* Serotype Typhimurium with Dendritic cells is defined by targeting to compartments lacking lysosomal membrane glycoproteins. **Infect Immun**. 2000, 2985-2991.
- Ramaprakash, H.; Ito, T.; Strandiford, T. J.; Kunkel, S. L.; Hogaboam, C. M. Tolllike receptor 9 modulates immune response to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and allergic mice. **Infect Immun**. 2009, 77:108-119.
- Ramirez-Ortiz, Z. G.; Specht, C. A.; Wang, J. P.; Lee, C. K.; Bartholomeu, D. C.; Gazzinelli, R. T.; Levitz, S. M. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. **Infect Immun**. 2008, 76:2123-2129.

- Rescigno, M.; Urbano, M.; Rimoldi, M.; Valzasina, B.; Rotta, G. Granucci, F.; Ricciardi-Castagnoli, P. Toll-like receptor 4 is not required for the full maturation of dendritic cells or for the degradation of Gram-negative bacteria. **Eur J Immunol.** 2002, 32:2800-6.
- Rodrigues, D. R.; Dias-Melicio, L. A.; Calvi, S. A.; Peraçoli, M. T.; Soares, A. M. *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, C. C.; Mendes-Giannini, M. J.; Duarte, A. J.; Bernard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine.** 2002, 18:149-57.
- Romano, C. C.; Mendes-Giannini, M. J.; Duarte, A. J.; Bernard 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.
- Rutault, K.; Alderman, C.; Chain, B. M.; Katz, D. R. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. **Free Radic Biol Med.** 1998, 26:232-238.
- Rutz, M.; Metzger, J.; Gellert, T.; Lippa, P.; Lipford, G. B.; Wagner, H.; Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. **Eur J Immunol.** 2004, 34: 2541–2550.
- Santos, S.; Ferreira, K. S.; Almeida, S. R. *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PLoS One.** 2011;6:e19690
- Serbina, N. V.; Salazar-Mather, T. P.; Biron, C. A.; Kuziel, W. A.; Pamer, E. G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity.** 2003, 19:59-70.
- Skrzypek, F.; Cenci, E.; Pietrella, D.; Rachini, A.; Bistoni, F.; Vecchiarelli, A. Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to *Candida albicans* through Syk activation. **Microbes Infect.** 2009, 661-670.
- Souto, J. T.; Figueiredo, F.; Furlanetto, A.; Pfeffer, K.; Rossi, M. A.; Silva, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol.** 2000, 156:1811-20.

- Souto, J. T.; Aliberti, J. C.; Campanelli, A. P.; Livonesi, M. C.; Maffei, C. M.; Ferreira, B. R.; Travassos, L. R.; Martinez, R.; Rossi, M. A.; Silva, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am J Pathol.** 2003, 163:583-90.
- Srinoulprasert, Y.; Pongtanalert, P.; Chawengkirttikul, R.; Chaiyaroj, S. C. Engagement of *Penicillium marneffe* conidia with multiple pattern recognition receptors on human monocytes. **Microbiol Immunol.** 2009; 53 : 162 – 172.
- Steele, C.; Marrero, L.; Swain, S.; et al. Alveolar macrophage mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. Muris involves molecular recognition by the dectin-1 b-glucan receptor. **J Exp Med.** 2003, 198:1677-1688.
- Steele, C.; Rapaka, R. R.; Metz, A. et al. The beta-glucan receptor Dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. **PLoSPathog.** 2005, 1:e42.
- Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Ver Immunol.** 1991, 9:271-96. Review.
- Suran, S.; Brown, G.D.; Ghosh, M.; Gordon, S.; Loper, R.; Taylor, P.R.; Akira, S.; Uematsu, S.; Williams, D.L.; Leslie, C.C. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and Cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. **J Biol Chem.** 2006, 281:5506-5514.
- Tavares, A. H.; Derengowski, L. S.; Ferreira, K. S.; Silva, S. S.; Macedo, C.; Bocca, A. L.; Passos, G. A.; Almeida, S. R.; Silva-Pereira, I. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012, 6:e1459.
- Tavian, E. G.; Dias-Melicio, L. A.; Acorci, M. J.; Graciani, A. P.; Peraçoli, M. T.; Soares, A. M. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Cytokine.** 2008, 41: 48-53.
- Toledo, R. G.; Da Silva, W. D.; Calich, V. L.; Kipnis, T. L. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Immunol.** 2010, 48:26-36.
- Van Bruggen, R.; Drewniak, A.; Jansen, M.; Van Houdt, M.; Ross, D.; Chapel, H.; Verhoeven, A.J.; Kuijpers, T.W. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the

major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. **Mol Immunol.** 2009, 47:575-581.

- Van de Veerdonk, F. L.; Netea, M. G.; Jansen, T. J.; Jacobs, L.; Verschueren, I.; van der Meer, J. W.; Kullberg, B. J. Redundant role of TLR9 for anti-Candida host defense. **Immunobiology.** 2008, 213: 613-620.
- Van Kooyk, Y. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. **Biochem Soc Trans.** 2008, 36:1478-81.
- Van Vliet, S. J.; Den Dunnen, J., Gringhuis, S. I.; Geijtenbeek, T. B.; Van Kooyk, Y. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. **Curr Opin Immunol.** 2007, 19:435-40
- Van Vliet, S. J.; García-Vallejo, J. J.; Van Kooyk, Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. **Immunol Cell Biol.** 2008, 86:580-7. Review.
- Vulcano, M.; Dusi, S.; Lissandrini, D.; Badolato, R.; Mazzi, P. *et al.* Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. **J Immunol.** 2004, 173:5749-5756.
- Viriyakosol, S.; Fierer, J.; Brown, G. D.; Kirkland, T. N. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. **Infect Immun.** 2005,73:1553-1560.
- Watts, C.; West, M. A.; Zaru, R. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. **Curr Opin Immunol.** 2010, 22:124-30.
- Zanoni, I.; Granucci, F. Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. **J Mol Med.** 2010.