



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

Yohan Ricci Zonta

**Ação da DNase produzida por *Paracoccidioides  
brasiliensis* em NETs (Neutrophil Extracellular Traps)  
liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo**

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu  
2020

Yohan Ricci Zonta

Ação da DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* em NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo

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

Orientadora: Profa.Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu  
2020

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

Zonta, Yohan Ricci.

Ação da DNase produzida por *Paracoccidioides*  
*brasiliensis* em NETs (Neutrophil Extracellular Traps)  
liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo /  
Yohan Ricci Zonta. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio

Capes: 21102007

1. *Paracoccidioidomicose*. 2. *Paracoccidioides*  
*brasiliensis*. 3. Neutrófilos. 4. Fungos. 5. Resposta  
imune.

Palavras-chave: DNase; NETs; Neutrófilos; *Paracoccidioides*  
*brasiliensis*; *Paracoccidioidomicose*.

*Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infecciosos da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).*

*Dedicatória*

Dedico este trabalho à minha família, que muitas vezes deixou seus sonhos de lado para acreditar nos meus.

A minha mãe e meu padrasto, Edilene e Luiz, por serem pessoas sensacionais e por me darem todo o suporte necessário para seguir meu caminho.

Aos meus avós, Rubens e Maria Zoraide, por estarem comigo sempre e me ensinarem a acreditar que tudo é possível.

Amo todos vocês.

*Agradecimentos*

Agradeço a Deus, por ter permitido que eu tivesse possibilidade de passar por diversas situações e aprender muito em cada uma delas.

À minha orientadora professora Luciane Alarcão Dias-Melicio, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e por ter me proporcionado tantos momentos, podendo aprender em todos eles. Obrigado pela confiança, pelo respeito e por me incentivar sempre a seguir meus sonhos.

À toda minha família. Obrigado pela educação e pelo empenho em sempre me fazer seguir em frente, enfrentando meus medos e me dando a confiança para seguir em busca de meus objetivos.

À minha namorada, Lívia, por me ajudar sempre a superar os desafios e, principalmente, por entender os momentos de ausência devido à compromissos do Mestrado.

Aos meus amigos Lucas (Alternar), Eric (Japa), Yuri (Mosca) e Eric (Blastoise), pelo apoio e por todos os momentos de descontração que me ajudaram a passar pelos momentos difíceis.

Agradeço em especial ao Kaio (Bruce), por ter sido um irmão e companheiro de laboratório, me ajudando, ensinando e aprendendo comigo a cada momento. Obrigado por me ajudar todos os dias.

À minha amiga e ex-companheira de laboratório Amanda, por partilhar todo o seu conhecimento de trabalho e por mostrar que uma amizade pode ser tão forte em tão pouco tempo. Obrigado por toda a ajuda, dentro e fora do laboratório.

Às colegas de laboratório Larissa, Tati, Jessica, Gabrielly, Ana Laura e Carol por toda a ajuda e confiança. Obrigada pela convivência, sempre buscando a melhor oportunidade para aprender e partilhar experiências.

Ao professor Paul Kubes da University of Calgary, e seus alunos, em especial Rachel e Michelle, por serem sempre tão solícitos e dispostos a me ajudar sem medir esforços, compartilhando conhecimento e sabedoria.

À professora Márcia Guimarães da Silva e seus alunos, pela boa convivência e por todos os momentos de aprendizados e ensinamentos.

Ao professor Valdecir Farias Ximenes, por me receber em seu laboratório e me ajudar sempre tão solicitamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia pelos momentos de aprendizado e ensinamentos.

À Vânia Soler, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, por me atender tão prontamente e sempre com tanta dedicação.

Aos funcionários que me auxiliaram em cada experimento, Carolina do Centro de Microscopia do Instituto de Biociências de Botucatu, Leandro e Igor da UNIPEX e aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por permitirem sempre que eu pudesse ter as melhores oportunidades.

Aos voluntários que doaram sangue para o projeto, por permitirem que meu trabalho fosse realizado e a todos, que de alguma maneira, contribuíram para a realização desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio à pesquisa e bolsa de mestrado (Processos nº 2017/26230-3 e 2018/09706-7), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Esta bolsa foi concedida no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES para a concessão de bolsas em instituições públicas e privadas sem fins lucrativos de ensino superior do Estado de São Paulo.

Resumo

## Resumo

A paracoccidioidomicose é uma doença fúngica sistêmica, considerada endêmica na América Latina, principalmente no Brasil, Venezuela, Argentina e Colômbia. Seus agentes etiológicos, fungos do complexo *Paracoccidioides*, possuem habitat geográfico restrito, conídios como forma infectante e características termodimórficas. A infecção ocorre por inalação dos conídios infectantes, levando a uma resposta imune grave nos pulmões e, dependendo da forma clínica, disseminação para outros órgãos. Os neutrófilos (PMNs) são responsáveis por uma importante resposta de defesa, liberando NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), que podem aprisionar e possivelmente destruir as leveduras. No entanto, foi descrito que alguns patógenos são capazes de escapar dessas estruturas de DNA liberando DNase como fator de virulência. Como diferentes padrões de NETs foram identificados em culturas de PMNs desafiadas com duas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, procuramos avaliar se essas diferenças na conformação de NETs estariam relacionadas à capacidade de tais cepas produzirem DNase, ou uma proteína com atividade semelhante à DNase, que teria a capacidade de degradar as NETs. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi identificar se diferentes padrões de NETs liberados por PMNs humanos desafiados com cepas Pb18 (virulenta) e Pb265 (avirulenta) seriam correlacionados com a capacidade dos fungos em produzir DNase. Para este fim, os PMNs de indivíduos saudáveis foram isolados e desafiados *in vitro* com ambas as cepas de *P. brasiliensis*. A produção, liberação e conformação de NETs em resposta aos fungos foram avaliadas por Microscopia Confocal, Microscopia de Varredura e Imunoensaio para quantificação de NETs; a identificação de DNase fúngica foi avaliada por DNase TEST Agar e a expressão relativa de genes que codificariam proteínas hipotéticas identificadas no genoma dos fungos, foi investigada por RT-qPCR. Foi possível verificar a liberação de NETs pelos PMNs, mostrando diferentes conformações de NETs quando em contato com ambas as cepas do fungo. A cepa Pb18 induziu a liberação de NETs mais frouxas, maiores e com aspecto de uma rede aberta em comparação à cepa Pb265, que induziu a liberação de redes mais densas e compactas. Isto se dá, possivelmente, pela liberação de uma proteína semelhante à DNase pela cepa virulenta, fato confirmado pelo DNase Test Agar que demonstrou a capacidade de produção de enzima que causou a degradação do DNA do meio pela cepa virulenta, enquanto a cepa avirulenta não foi capaz de degradá-lo. Por fim, conseguimos identificar que os genes PADG\_08528 e PADG\_11161, que poderiam ser responsáveis por uma proteína DNase-like hipotética estavam sendo expressos nas culturas desafiadas com os fungos, sendo o gene PADG\_08528 altamente expresso pela cepa virulenta, sugerindo que esse gene poderia ter uma contribuição maior para essa produção. Portanto, a cepa virulenta pode estar produzindo DNase como um importante mecanismo de escape do fungo para driblar ação das NETs, subvertendo assim esse importante mecanismo efetor de neutrófilos.

**Palavras-chave:** Paracoccidioidomicose; *Paracoccidioides brasiliensis*; Neutrófilos; NETs; DNase

*Abstract*

## Abstract

Paracoccidioidomycosis is a systemic fungal disease, considered endemic in Latin America, mainly in Brazil, Venezuela, and Colombia. Its etiological agents, fungi of the *Paracoccidioides* complex, have restricted geographical habitat, conidia as an infectious form and thermomorphogenic characteristics. The infection occurs by inhalation of infective conidia, leading to a severe immune response in the lungs and, depending on the clinical type, spread to other organs. Neutrophils (PMNs) are responsible for an important defense response, releasing NETs (Neutrophil Extracellular Traps), which can envelop and destroy yeasts. However, it has been reported that some pathogens can escape from these DNA structures by releasing DNase as a virulence factor. As different NET patterns were released in PMN cultures challenged with different *Paracoccidioides brasiliensis* strains, we sought to assess whether these differences in NETs would be related to the ability of such strains to produce DNase, or a protein with activity similar to DNase, which would have the ability to degrade NETs. Thus, the general objective of this study was to identify different patterns of NETs released by human PMNs challenged with Pb18 (virulent) and Pb265 (avirulent) strains and correlate this with the capacity of fungi to release DNase. To this end, isolated PMNs were isolated and challenged *in vitro* with both strains of *P. brasiliensis*. The production, release and configuration of NETs in response to fungi were evaluated by Confocal Microscopy, Scanning Microscopy and Immunoassay to quantify NETs; the identification of fungal DNase was evaluated by DNase TEST Agar and relative expression of genes encoding hypothetical proteins identified in the fungal genome, was investigated by RT-qPCR. It was possible to verify the release of NETs by PMNs, showing different forms of NETs when coming into contact with different strains of the fungus. A Pb18 strain induced the release of looser, larger NETs with the appearance of an open network compared to the Pb265 strain, which induced the release of denser and more compact NETs. Thus, it was identified that a virulent strain is possibly inducing looser and more degraded NETs, probably by releasing a DNase-like protein, a fact confirmed by the DNase Test Agar, which demonstrates the ability to produce enzymes that cause the degradation of DNA from the medium by the virulent strain, while an avirulent strain was not able to degrade it. Finally, we identified the expression of genes PADG\_08528 and PADG\_11161, probably involved with the production of hypothetical protein similar to DNase, being the gene PADG\_08528 highly expressed in the virulent strain, suggesting that this gene could have a greater contribution to this production. Therefore, the virulent strain may be producing DNase as an important escape mechanism of the fungus to circumvent the action of NETs, thus subverting this important neutrophil effector mechanism.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; Neutrophils; NETs; DNase

## Sumário

### Capítulo I

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| 1. Revisão Bibliográfica .....                   | 2  |
| 1.1. Paracoccidioidomicose (PCM) .....           | 2  |
| 1.2. Neutrófilos e a Paracoccidioidomicose ..... | 6  |
| 1.3. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) ..... | 8  |
| 1.4. DNase. ....                                 | 14 |
| 2. Referências .....                             | 18 |

### Capítulo II

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 3. Manuscrito.....            | 30 |
| Abstract .....                | 31 |
| Introduction.....             | 32 |
| Experimental Procedures ..... | 36 |
| Results.....                  | 40 |
| Discussion .....              | 45 |
| References.....               | 49 |
| Figuras .....                 | 53 |
| 4. Anexos .....               | 63 |

# Capítulo 1

## Revisão Bibliográfica

## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica sistêmica. É uma infecção considerada endêmica em toda a América Latina, com seus principais focos de infecção no Brasil, Venezuela e Colômbia, sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade em suas regiões endêmicas, principalmente em áreas rurais<sup>1-5</sup>. Os agentes etiológicos são fungos pertencentes ao Complexo de espécies *Paracoccidioides*. Anteriormente, este complexo de espécies era dividido em *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e suas espécies crípticas S1, PS2, PS3 e PS4, e a espécie *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*), também chamado de Pb01-like, que recebeu este nome em homenagem ao médico Adolpho Lutz, que fez sua descrição em 1908<sup>6-8</sup>. Porém, mais recentemente, uma nova nomenclatura foi proposta, avaliando as diferenças morfológicas e genéticas entre as espécies, por meio de análises de polimorfismo molecular e reconstrução filogenética das leveduras e micélios das diferentes espécies crípticas, e propondo assim a divisão em cinco diferentes espécies, sendo elas *P. brasiliensis* (correspondente a antiga S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4) e *P. lutzii* (Pb01-like)<sup>9</sup>.

Por serem pertencentes à mesma família de outros agentes causadores de micoses sistêmicas, como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*<sup>5</sup>, entre outros, as espécies de *Paracoccidioides* compartilham de características semelhantes a estes fungos, como o habitat geográfico restrito, a presença de conídios como forma infectante e sua característica termodimórfica<sup>3, 5</sup>. O dimorfismo térmico se caracteriza pela capacidade do fungo em alterar sua morfologia de acordo com a temperatura a que está exposto, apresentando-se sob a forma de micélio quando exposto à temperatura ambiente (entre 4 e 28°C), e alterando sua morfologia para leveduras ao adentrar o corpo humano e ficar exposto a temperatura corporal (37°C). Este mecanismo serve como um importante fator de sobrevivência fúngica no meio ambiente<sup>3, 5, 10</sup>.

Um fato interessante, descrito por diversos artigos, é a identificação do fungo em diferentes espécies de animais, que serviriam como reservatórios naturais para o patógeno. Estudos já identificaram a presença de várias espécies de *Paracoccidioides* em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, cães de áreas rurais, gado, e mais recentemente em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a espécie de peixe mais consumida nas regiões endêmicas de PCM no Brasil, entre outros animais<sup>11-15</sup>.

A infecção por *Paracoccidioides spp* ocorre por meio da inalação dos conídios infectantes, produzidos pelos micélios em temperatura ambiente, presentes principalmente no solo<sup>10,16-20</sup>. Os principais pacientes infectados são trabalhadores rurais, que devido à sua atividade laboral acabam ficando expostos aos micélios presentes no solo e, conseqüentemente, propensos à inalação dos conídios infectantes<sup>10,21</sup>. Após a inalação, os conídios infectantes se direcionam aos pulmões, mais especificamente aos bronquíolos e alvéolos pulmonares, instalando-se nestes e transformando-se em leveduras, devido à temperatura corporal de 37°C, formando, assim, o chamado Complexo Pulmonar Primário<sup>21,22</sup>. A partir da formação do complexo pulmonar, a infecção pode ser contida ou evoluir para as formas clínicas da doença. A PCM assintomática ou PCM infecção, trata-se de uma cura espontânea, na qual o sistema imune do paciente consegue eliminar o patógeno ou colocá-lo em estado de latência. Esta forma caracteriza-se pela ausência de sintomas e sinais clínicos da doença, porém pode ser identificada por meio de teste intradérmico realizado com antígeno paracoccidioidina, que identifica a resposta imune celular desenvolvida contra o fungo<sup>23</sup>.

Caso a infecção não seja contida, ocorre progressão e disseminação do fungo por via linfo- hematogênica, atingindo outros órgãos, como baço, fígado e linfonodos, além de chegar à pele e mucosas, causando lesões graves, caracterizando, assim, a chamada PCM Doença<sup>10</sup>. Assim, é possível afirmar que a PCM pode variar desde uma forma assintomática até uma forma sintomática, grave, disseminada pelo organismo e potencialmente fatal<sup>4,5,16</sup>.

A forma sintomática e disseminada ainda é dividida em duas formas clínicas, caracterizadas e diferenciadas de acordo com a faixa etária dos pacientes e dos tecidos e órgãos acometidos no organismo<sup>16,24</sup>. A chamada Forma Aguda/Subaguda ou forma juvenil, é comum em pacientes mais jovens, principalmente crianças e jovens adultos, de ambos os sexos. Nesta forma, o fungo apresenta tropismo pelo sistema fagocítico-

mononuclear, atingindo fígado, baço e linfonodos, causando sintomas como linfonodomegalia e hepatoesplenomegalia, sendo considerada a forma mais grave da doença, atingindo, entretanto, apenas 5%-25% dos pacientes infectados<sup>16</sup>. Já a Forma Crônica apresenta uma progressão gradual e lenta, afetando 75%-95% dos pacientes infectados, principalmente adultos do sexo masculino, com duração prolongada, apresentando as lesões mais comumente em pulmões, mucosas e pele<sup>16,25,26</sup>. Esta forma apresenta-se principalmente na forma de lesões crônicas nos pulmões, levando a uma fibrose pulmonar, que pode ser identificada por Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (HRCT) como “Lesões em Vidro Fosco”<sup>27</sup>. Além disso, podem ocorrer lesões em mucosas, principalmente nos lábios e gengivas, chamadas de Estomatite Muriforme<sup>28</sup>. Em mulheres, este desenvolvimento da doença é raro, uma vez que a transformação dos conídios infectantes em leveduras é dificultada por um mecanismo baseado na ação de hormônios femininos como o estrógeno<sup>29</sup>.

Nos pulmões, após formação do Complexo Pulmonar Primário, sob o ponto de vista histopatológico, ocorre a formação de granuloma, lesão caracterizada pela agregação de macrófagos diferenciados em células epitelióides e células gigantes de Langhans (multinucleadas), que aprisionam as leveduras, com o objetivo de impedir sua disseminação<sup>30</sup>. Estas lesões podem ser encontradas em ambas as formas da doença, atingindo pulmões, mucosas e o sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço e linfonodos). Entretanto, as lesões pulmonares e mucosas são pouco comuns na forma Aguda/Subaguda<sup>16,25,26,31</sup>.

Após a inalação dos conídios, a instalação, o desenvolvimento e a progressão da doença no organismo vão depender de diversos fatores, intrínsecos ao indivíduo e ao fungo. Os fatores relacionados ao paciente podem ser descritos como a idade, o sexo, os fatores genéticos e principalmente o comprometimento do sistema imunológico do indivíduo, enquanto os fatores intrínsecos ao fungo dependem principalmente dos fatores de virulência e de sua composição antigênica<sup>25,32,33</sup>. Como a progressão clínica da doença depende diretamente da resposta imune do paciente, diversos estudos foram conduzidos para verificar os padrões de resposta. Sabemos, por exemplo, que o padrão de resposta de resistência ao *P. brasiliensis* é mediado quase que predominantemente por uma resposta  $T_h1$ , enquanto o padrão de susceptibilidade à doença é mediado por um padrão de resposta predominante  $T_h2$ <sup>34</sup>. Dessa forma, a resposta imune contra o *P. brasiliensis*

vem sendo avaliada por diversos estudos, com o objetivo de entender melhor como o sistema imune combate o processo infeccioso causado pelo fungo<sup>25,34,35,36</sup>.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do corpo contra a entrada de diversos microrganismos, como o *P. brasiliensis* por exemplo. Esta resposta é composta por diversos tipos celulares que compõe uma importante barreira contra as infecções, que por meio da expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são capazes de reconhecer os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), e assim, produzir e liberar citocinas pró e anti-inflamatórias. Assim, essas células são capazes de eliminar o patógeno invasor à partir da ativação de diversos mecanismos, como a fagocitose e o *burst* oxidativo, com liberação de metabólitos como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o óxido nítrico (NO), dentre outros<sup>37</sup>.

Os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, como células fagocíticas, desempenham um importante papel no combate aos fungos patogênicos que invadem o organismo. Além do processo de fagocitose, que demonstra-se extremamente importante no combate a estes fungos, a atividade fungicida e a modulação de resposta inflamatória também merecem destaque<sup>38-49</sup>. É importante ressaltar que, para que esta resposta inflamatória seja ativada de forma eficaz, é necessária a modulação da mesma pelas citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF<sup>40-47</sup>.

Outro fato interessante é a diferença entre as respostas imunológicas que levam à progressão da doença para fase Aguda/Subaguda e Crônica. Estudos demonstraram que a PCM-Infecção ou assintomática é caracterizada por um perfil de resposta T<sub>h</sub>1<sup>34</sup>, associado a altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , citocinas extremamente importantes na ativação de macrófagos para a promoção de uma resposta imune eficaz contra o fungo<sup>34,50,51</sup>. A forma aguda/subaguda é caracterizada por um perfil de resposta T<sub>h</sub>2 e T<sub>h</sub>9, em adição a liberação de IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ , IL-9 e IL-21, ocorrendo um processo de eosinofilia e produção/liberação de anticorpos pelas células B (IgE e IgG4)<sup>34,52,53</sup>. Por fim, a forma crônica se apresenta por meio de um perfil de resposta imunológica do tipo T<sub>h</sub>17 e T<sub>h</sub>22, associado a uma produção e liberação de IL-17 e IL-22. Este perfil, apesar de promover uma resistência parcial em um primeiro momento, leva a danos teciduais graves e fibrose tecidual, gerando os sintomas característicos desta forma da doença<sup>23,25,34</sup>.

Desta forma, como os neutrófilos são uma das primeiras células da linha de defesa que atingem o sítio de infecção para combater o fungo quando este adentra o organismo, estudos recentes tem focado no papel destas células na PCM, tanto como células efetoras quanto moduladoras da resposta ao fungo, uma vez que tanto nas lesões quanto nos infiltrados inflamatórios presentes ao redor das lesões encontra-se uma grande concentração de células polimorfonucleares, o que demonstra um envolvimento intenso destas células no combate ao fungo<sup>35,48,49</sup>.

## 1.2 Paracoccidioidomicose e neutrófilos

Neutrófilos, ou como também são conhecidos, granulócitos polimorfonucleares (PMNs), são células do sistema imune inato, conhecidas como a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de microrganismos. Suas características mais importantes são seu núcleo, que apresenta-se de forma multissegmentada, ou seja, dividida em lóbulos, e a presença de grânulos em seu citoplasma, que são divididos em primários, secundários e terciários, e diferem entre si devido ao seu conteúdo. São originados na medula óssea, a partir de células mielóides precursoras<sup>54</sup>.

Cerca de 50 a 70% dos leucócitos circulantes no organismo são neutrófilos, e suas funções de proteção contra agentes patogênicos são efetuadas após seu recrutamento para o local da infecção. Este recrutamento se dá por meio da liberação de IL-8 e de *macrophage inflammatory protein-1-alpha* (MIP-1  $\alpha$ )<sup>37, 55,56</sup>. Durante o processo infeccioso, ocorre a liberação de citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- $\alpha$ , que induzem as células do endotélio vascular a expressarem moléculas de adesão em sua superfície, como as selectinas. Os neutrófilos circulantes na corrente sanguínea aderem ao endotélio e são atraídos ao local de interesse pelas quimiocinas secretadas. Para tanto, ocorre o processo de “rolamento celular” pela parede do vaso até o momento da adesão firme mediada pela ação das quimiocinas sobre a conformação de integrinas pelas células, e início de migração dos neutrófilos para o tecido alvo, processo este chamado de diapedese, pelo qual os neutrófilos passam através das junções das células endoteliais e atingem a área de infecção<sup>37,57-60</sup>.

Ao atingir o local da infecção e entrar em contato com os microrganismos, os neutrófilos iniciam os processos de combate e eliminação dos patógenos por vários processos<sup>61</sup>. Um destes processos, sendo uma das principais funções dos neutrófilos, é a fagocitose. Ao entrar em contato com o patógeno e ter seus receptores de membrana ativados, os neutrófilos emitem prolongamentos de sua membrana, conhecidos por pseudópodes, que envolvem o agente agressor e formam vesículas intracelulares, chamadas de fagossomos. Em seguida, ocorre uma fusão das vesículas com os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, que liberam seus conteúdos no interior do fagossomo, formando assim o fagolisossomo, que levará a morte do microrganismo, mediada por mecanismos dependentes e independentes de oxigênio<sup>62-64</sup>.

Primeiramente, os mecanismos dependentes de oxigênio, muito importantes no processo de eliminação do patógeno, baseiam-se na produção e liberação de ânions superóxido ( $O_2^-$ ). Este processo, mediado pela enzima NADPH oxidase, consiste na liberação destes ânions por neutrófilos ativados. Após a liberação, o ânion  $O_2^-$  transforma-se, quando em contato com água, em  $H_2O_2$  e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), derivados tóxicos de oxigênio<sup>65</sup>. Além disso, quando catalisada pela mieloperoxidase, um componente importante de grânulos citoplasmáticos de PMNs, nos fagolisossomos, os derivados de oxigênio formam ácido hipocloroso (HClO), sendo este também, um ácido importante no processo de morte dos microrganismos fagocitados<sup>65-67</sup>. Diversos estudos já demonstraram que os derivados de oxigênio são extremamente importantes no combate a microrganismos, dentre eles, o próprio *P. brasiliensis*<sup>68-71</sup>.

Os mecanismos não dependentes de oxigênio baseiam-se na liberação dos conteúdos de grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Estes grânulos são divididos em primários, secundários e terciários, sendo que cada tipo possui em seu interior componentes diferentes, sendo enzimas e proteínas com atividades microbidas. Os grânulos primários, também chamados de grânulos azurófilos, contêm mieloperoxidase (MPO), responsável pela conversão dos derivados de oxigênio em ácido hipocloroso, além de lisozimas, proteases (como a elastase) e peptídeos microbianos. Os secundários são compostos por collagenases e lactoferrina e os terciários, por gelatinases<sup>72</sup>.

Um dos primeiros estudos descrevendo o envolvimento de neutrófilos na resposta imune contra a infecção por *P. brasiliensis* demonstrou a presença de PMNs no sítio de infecção 24 horas após a inoculação do fungo. Isso demonstrou que os

neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo contra esta infecção, sendo as primeiras células do sistema imune a atingir o local e iniciar o processo de combate ao microrganismo<sup>73</sup>. Após este estudo, diversos outros trabalhos demonstraram a presença de neutrófilos no sítio de inflamação e em granulomas, tanto em modelos experimentais quanto em humanos<sup>35,74,75</sup>.

Com o tempo, reconhecendo-se a provável importância dessas células na PCM, diversos estudos tiveram por objetivo avaliar os mecanismos de morte fúngica intracelular comandada pelos neutrófilos. O *killing* induzido por mecanismos dependentes ou não de oxigênio são extremamente importantes para o processo de combate à infecção por *P. brasiliensis* no organismo. Porém, como as leveduras do fungo apresentam um tamanho significativamente maior que os neutrófilos<sup>76</sup>, o processo de fagocitose que precede este tipo de morte celular acaba sendo dificultado. Um estudo já descreveu que, quando um microrganismo apresenta tamanho muito elevado, os neutrófilos encontram outra forma de combatê-los. Este outro mecanismo de combate a agentes patogênicos é conhecido como NETose, um processo que consiste na liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos, ou como foi primeiramente descrita, Neutrophil Extracellular Traps (NETs)<sup>77,78</sup>.

### 1.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Como foi citado anteriormente, em 2004 foi descrito um novo processo de combate a microrganismos por parte dos neutrófilos. Este processo foi entendido inicialmente como sendo um processo de morte dos PMNs, seguida da liberação de redes extracelulares, formadas por cromatina descondensada e componentes granulares, as quais foram chamadas de Neutrophil Extracellular Traps (NETs)<sup>77</sup>. O processo de liberação dessas redes, chamado de NETose, consiste em um processo no qual os neutrófilos são ativados e liberam redes para o meio extracelular, compostas de seu conteúdo nuclear (cromatina descondensada e histonas) conjugadas aos componentes de grânulos citoplasmáticos (Mieloperoxidase, elastase e catepsina G, por exemplo). Estas redes têm por função aprisionar os microrganismos e matá-los, por meio das proteínas

granulares presentes nelas, ou simplesmente capturá-los para impedir a disseminação e permitir que outras células do sistema imune possam atuar<sup>77</sup>.

Estas NETs são estruturas frágeis, formadas por fibras de 15 a 17nm de diâmetro de DNA, com domínios globulares de 25nm, agrupadas em forma de rede. Este processo foi descrito como sendo desencadeado por diversos estímulos, como IL-8, bactérias gram-positivas e negativas e fungos, além do PMA (Phorbol Myristate Acetate), um forte ativador de resposta imune<sup>77-79</sup>. Com a descoberta das NETs, diversos estudos iniciaram a busca por estas estruturas em culturas de neutrófilos desafiadas com outros microrganismos, além de outros possíveis estimuladores de sua liberação<sup>78-82</sup>.

Além de estudos envolvendo humanos, as NETs já foram identificadas em camundongos, gatos, bovinos, cavalos e peixes. Um estudo recente descreveu, inclusive, a produção e liberação de NETs em seres invertebrados, mostrando que a liberação das redes é um mecanismo evolutivo importante para a sobrevivência das espécies, sendo conservado ao longo de vários anos pelos neutrófilos<sup>78-85</sup>.

Apesar de ter sido inicialmente descrita em neutrófilos, surgindo disso o nome NETs, a liberação das redes extracelulares, eu simplesmente ETs, foram descritas em diversas células do sistema imune, tais como monócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e mastócitos<sup>86-92</sup>.

O processo de formação e liberação das NETs conta com o envolvimento de conteúdos nucleares e granulares. Os conteúdos nucleares são basicamente histonas associadas a cromatina descondensada. Já os conteúdos granulares são, basicamente, elastase, mieloperoxidase (MPO), calprotectina e outras proteínas do citoesqueleto, citosol, pentraxina-3 (PTX-3), catalase e enzimas glicolíticas<sup>77,93-97</sup>. Dentre todas as enzimas e proteínas pertencentes aos componentes granulares, a elastase e MPO desempenham um papel importante na deflagração do processo de Netose. Ambas são extremamente importantes no processo de citrunilação das histonas e descondensação da cromatina, uma vez que degradam a ligação entre as histonas e iniciam o processo de formação das redes<sup>95,96,98</sup>. Estudos indicam que os receptores envolvidos no processo de Netose são, principalmente, dos tipos Fc e TLRs (Toll Like Receptors), além de contar com o envolvimento de citocinas<sup>99,100</sup>.

O processo de liberação das NETs, descrito por Brinkmann et al, 2004 e Fuchs et al, 2007, consiste em alguns passos que ocorrem no interior da célula. Primeiramente, ocorre a estimulação de receptores de membrana dos neutrófilos pelos agentes patogênicos. Com o estímulo, a célula sofre achatamento e adesão ao substrato. Após esta estimulação, se inicia o processo de citrunilação das histonas, mediado pela MPO e elastase. Este processo consiste na perda estrutural e funcional das histonas, levando ao início do processo de descondensação da cromatina. Com a descondensação, a célula perde seu aspecto multinuclear e passa a ter apenas um núcleo, ao mesmo tempo em que os grânulos citoplasmáticos começam a se degradar. Por fim, o núcleo começa a se desfazer em forma de vesículas, que se fundem aos grânulos citoplasmáticos e se direcionam à membrana celular, onde, com a degradação da membrana e formação de poros na mesma, estas vesículas serão eliminadas do interior da célula e, no exterior, formarão as chamadas NETs<sup>77,99</sup>.

O processo de Netose, em suas primeiras descrições, era tomado como um processo de morte celular, uma vez que o núcleo dos neutrófilos era totalmente desfeito e sua membrana celular, degradada. Um dos primeiros estudos envolvendo NETs verificou que, após a ativação dos PMNs com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), observou-se diversas alterações no núcleo, citoplasma e membrana dos neutrófilos, sendo que estas alterações eram incompatíveis com a sobrevivência da célula. Além disso, este mesmo estudo demonstrou as diferenças entre este processo e outros processos de morte celular<sup>99</sup>. Um fato importante é que o processo de Netose diferenciase dos outros processos de morte celular, como apoptose e necrose. A diferença em relação à apoptose dá-se pelas ausências da fragmentação do DNA e da exposição de fosfatidilserina, enquanto a diferença em relação à necrose dá-se pela ausência da manutenção da integridade do envelope nuclear, que não ocorre na Netose<sup>99-100</sup>.

Entretanto, um estudo publicado em 2013 chamou a atenção em relação às NETs demonstrando resultados interessantes<sup>101</sup>. Este estudo mostrava que o processo de Netose, até então conhecido como um processo de morte celular, poderia não envolver necessariamente a morte dos neutrófilos. Yipp e Kubes (2013) demonstraram que o processo de liberação das redes extracelulares poderia ser dividido em dois processos diferenciados. O primeiro consistiria no processo descrito anteriormente por Fuchs et al. (2007), chamado agora de Netose Suicida<sup>99</sup>, enquanto o novo processo, descrito por estes autores, seria chamado de Netose Vital. Este novo processo demonstrou a

capacidade dos neutrófilos que ao liberarem NETs, mantinham a integridade estrutural suficiente para exercer suas funções normais. Este processo dá-se pela formação de vesículas na membrana nuclear, contendo apenas parte do conteúdo nuclear. Estas vesículas direcionam-se à membrana e sofrem processo de extrusão para o meio extracelular, sem que ocorra a degradação da membrana, o que causaria a morte celular<sup>101,102</sup>. Um estudo, publicado em 2009, demonstrou a capacidade dos neutrófilos em liberarem NETs a partir de conteúdo genético mitocondrial, corroborando, assim, os resultados publicados em 2013<sup>103</sup>.

Um indutor conhecido da formação e liberação das NETs é o PMA (Phorbol Miristato Acetato), uma molécula sintética responsável pela ativação da Proteína C Quinase (PKC). Desde o primeiro estudo sobre NETs, publicado em 2004, o PMA já foi descrito como um estimulador do sistema imune e indutor da liberação destas redes<sup>76</sup>. Após este artigo, diversos outros autores vêm utilizando PMA como controle positivo para seus experimentos envolvendo as redes extracelulares<sup>49,94,95</sup>. O mecanismo de liberação de NETs induzido pelo PMA está ligado diretamente à produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), que são essenciais para o processo de produção e liberação das redes<sup>104,105</sup>.

A atividade de EROs no processo de liberação de redes extracelulares já foi descrito por diversos trabalhos. Um dos estudos demonstrou que pacientes com deficiência na produção da enzima NADPH oxidase apresentavam uma capacidade diminuída na produção e liberação de NETs quando em contato com o agente patogênico *Aspergillus nidulans*<sup>106</sup>. Outro estudo demonstrou que a capacidade de eliminar agentes patogênicos das NETs era ampliada quando em contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>107</sup>.

Em 15 anos de estudos, diversos microrganismos foram descritos como capazes de induzir a liberação de redes extracelulares por células do sistema imune. Dentre os organismos, podemos citar *S. aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania amazonensis*, entre outros<sup>77,94,108</sup>. A função principal das redes, de eliminar os patógenos, foi demonstrada por diversos mecanismos, como a atuação das histonas e elastase presentes nas NETs, além da atuação de outros mecanismos mediados por proteínas granulares, como a calprotectina, que apresenta atividade antifúngica<sup>94,109</sup>.

A função secundária das NETs, de aprisionar os microrganismos, foi foco de diversos estudos, que demonstraram esta ação contra diversos agentes patogênicos,

como: *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *S. aureus*, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) e *P. brasiliensis*, entre outros<sup>48,49,77,110-113</sup>. Como estes microrganismos apresentam mecanismos de escape das redes, a função das NETs fica restrito apenas ao aprisionamento, permitindo que outras células do sistema imune possam chegar ao local e desenvolver sua atividade microbicida<sup>112</sup>.

Um fato importante é que, até pouco tempo, as NETs apresentavam-se como um mecanismo benéfico, ajudando no controle e eliminação de agentes patogênicos do organismo, e funcionando como um mecanismo eficaz do sistema imune no combate às infecções. Porém, estudos recentes identificaram a presença de redes extracelulares em diversas condições patológicas humanas. Fuchs et al, em 2010, demonstraram que as NETs têm capacidade de promover uma adesão e agregação plaquetária, causada principalmente pelas histonas presentes nas redes, além de servir como uma região de depósito de fibrina, promovendo a organização de um trombo e iniciando, assim, um processo de trombose<sup>114</sup>. Somado a isso, outro estudo identificou a presença de DNA extracelular livre no plasma em casos de Trombose Venosa Profunda (TVP)<sup>114,115</sup>.

Em relação às doenças autoimunes, as NETs já foram identificadas como causadoras ou intensificadoras, participando da patogenia de algumas doenças bem como da etiologia. Isso ocorre, uma vez que alguns componentes das redes podem ser identificados pelo organismo como componente estranho, iniciando assim uma resposta autoimune. Este mecanismo já foi identificado em estudos de Psoríase, Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e, mais recentemente, em Hidradenite Supurativa (HS). Nos estudos de SLE, foram encontrados anticorpos contra antígenos nucleares, como DNA de dupla fita e histonas. Como estes são os principais componentes das NETs, somados ao elevado nível de proteínas granulares no sangue, a presença de NETs nas lesões teciduais era grande, o que causava um aumento significativo no dano causado ao tecido<sup>116,117</sup>. Outro estudo demonstrou que pacientes que sofriam de Psoríase, apresentavam um grande número de PMNs e mastócitos nas áreas de lesão, associado ao aumento de IL-17 nas lesões. A presença de IL-17 já foi descrita como um fator agravante em doenças autoimunes, contribuindo para o aumento da resposta imune no local das lesões<sup>118</sup>. Por fim, recentemente foi publicado um estudo avaliando o papel das NETs na Hidradenite Supurativa, uma doença autoimune incapacitante que causa lesões de pele semelhante a abscessos. Neste estudo, publicado em 2019, a presença de inúmeros neutrófilos foi identificada na área das lesões, além de uma grande quantidade

de NETs. Um fato interessante descrito pelo artigo foi que os neutrófilos de sangue periférico de pacientes que sofrem de HS apresentam uma tendência muito maior de liberar NETs ao menor estímulo, quando comparados com neutrófilos de pacientes saudáveis<sup>119</sup>.

Focando um pouco na relação das NETs com o fungo *P. brasiliensis*, estudos sobre esse processo iniciaram-se recentemente, uma vez que existem diversos artigos avaliando a interação entre as redes extracelulares e fungos patogênicos, como a interação das NETs com *C. albicans*<sup>105</sup>, *Aspergillus fumigatus*<sup>106</sup> e *Cryptococcus neoformans*<sup>120</sup>, entre outros.

Os estudos sobre a capacidade dos fungos do complexo *Paracoccidioides* induzirem a liberação de NETs começaram a serem publicados em 2015, com Mejía et al<sup>121</sup>. Os autores demonstraram que o fungo *P. brasiliensis* possui capacidade de induzir a liberação de redes extracelulares por neutrófilos humanos saudáveis. Outro resultado importante é que a formação de NETs em resposta aos conídios infectantes do fungo demonstrou ser independente da produção de EROs, enquanto a resposta à levedura foi inteiramente dependente da ativação de NADPH oxidase. O artigo também demonstrou que as NETs não tem por função primária eliminar o fungo, mas sim aprisioná-lo, o que foi demonstrado pela ativação da NADPH oxidase, provavelmente como um mecanismo futuro de eliminação do patógeno<sup>121</sup>.

No mesmo ano de publicação do trabalho citado anteriormente, mais dois artigos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando o processo de produção e liberação das redes em resposta ao *P. brasiliensis* foram publicados. Della Coletta et al. (2015) avaliaram a presença de NETs em lesões tegumentares de pacientes acometidos por PCM. Foram também avaliadas culturas de neutrófilos desafiados por duas cepas de *P. brasiliensis*, sendo elas Pb18, a cepa mais virulenta, e Pb265, a cepa avirulenta. As lesões foram avaliadas por Microscopia Confocal, com marcação de anticorpos para elastase e histona, além da marcação do DNA com DAPI. Os resultados deste estudo demonstraram a presença de NETs nas lesões cutâneas, além de um resultado muito importante: uma diferença no padrão das redes liberadas em resposta a cada cepa. A cepa virulenta induziu a liberação de NETs mais frouxas, amplas e delicadas, enquanto a cepa avirulenta induziu a liberação de redes mais densas e compactas. Estes resultados foram confirmados por microscopia de varredura, utilizando-se neutrófilos desafiados

com ambas as cepas. Após a avaliação destes resultados, os autores lançaram a hipótese de que a cepa virulenta poderia estar causando a degradação do DNA presente nas redes pela liberação de uma proteína DNase-like, que serviria como mecanismo de defesa do fungo, para promover uma forma de escape das NETs e sobreviver ao processo<sup>49</sup>.

Bachiega et al. (2016) também demonstraram que a liberação de NETs em resposta ao fungo era dependente da ativação principal dos receptores Dectina-1. Este estudo também utilizou a cepa virulenta de *P. brasiliensis*, a Pb18. Outro resultado importante demonstrado foi que as NETs também contribuem para o processo de morte fúngica, uma vez que a atividade fungicida detectada antes e após a ativação de neutrófilos com TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e GM-CSF foi inibida significativamente pelo tratamento das culturas com DNase, degradando assim as redes e diminuindo a eficácia na eliminação do fungo<sup>48</sup>.

#### 1.4 DNase

A DNase é uma enzima pertencente ao grupo das desoxiribonucleases, que tem por principal função a degradação do esqueleto de fosfodiéster presente na estrutura do DNA. São proteínas presentes em grande parte das células eucariotas, e desempenham diversas funções no metabolismo celular. Existem diversos tipos de DNase, e cada tipo atua de maneira diferente ao executar sua função. Existem tipos de DNase que clivam qualquer lugar da cadeia de DNA, sendo chamadas de endodeoxirribonuclease, enquanto outros tipos clivam apenas as extremidades (exodeoxirribonuclease)<sup>118</sup>. Existem também os tipos que clivam apenas DNA de fita dupla, enquanto outros tipos são específicas para moléculas de fita simples e, ainda, outros são funcionais em relação a ambos<sup>122</sup>.

Além de serem moléculas intrínsecas às células de organismos eucariotos, importante para diversas funções celulares, a função das DNases como fator de virulência de diversos microrganismos tem sido também descrita. Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de patógenos liberarem DNase para sobreviver ao sistema imune. Um estudo recente descreveu a capacidade de cepas de *S. aureus* liberarem DNase para escapar da resposta imune. Ao entrar em contato com os neutrófilos, a

proteína A presente na parede bacteriana, além de impedir a fagocitose, estimula neutrófilos a iniciarem um processo de netose suicida, liberando NETs para aprisionar a bactéria. Porém, após a liberação das NETs, a bactéria escapa destas redes por meio da liberação de endonucleases como, por exemplo, pela produção de DNase<sup>123,124</sup>.

Gondara et al. (2017) demonstraram a capacidade do *Mycoplasma bovis*, um agente extremamente importante na medicina veterinária, de escapar das NETs e sobreviver ao sistema imune<sup>125</sup>. Esta bactéria é responsável por causar mastite, artrite e pneumonia em bovinos, e foi demonstrado sua capacidade de induzir a liberação das redes extracelulares quando em contato com neutrófilos destes animais. Além desta capacidade de indução das redes, foi demonstrado também que a bactéria apresenta a capacidade de liberar uma DNase, que estaria degradando o DNA presente nas NETs e atuando como um mecanismo de escape da resposta imune, sendo um importante fator de virulência, garantindo assim, a sobrevivência do microrganismo<sup>125</sup>.

A capacidade de liberação de endonucleases como forma de subverter o sistema imune tem sido descrito desde 2006, quando Buchanan et al. descreveu a capacidade de espécies de *Streptococcus pneumoniae* liberarem DNase para escapar do sistema imune e das NETs. Outro artigo também descreveu a bactéria *S. Suis* como sendo capaz de liberar DNase SSnA para evadir o sistema antimicrobiano mediado por NETs<sup>126,127</sup>.

Além destes estudos envolvendo a capacidade de liberação de endonucleases por bactérias, existem diversos estudos envolvendo esta capacidade de liberação por fungos. As doenças fúngicas são extremamente importantes no meio médico e, como vários estudos demonstram a capacidade de diversas espécies fúngicas em induzir a liberação de NETs, a busca pela identificação da liberação de endonucleases por estes microrganismos é de extrema importância.

Dentre os fungos mais relevantes na prática médica, encontra-se a *C. albicans*. Diversos estudos têm demonstrado a interação deste microrganismo com o sistema imune, inclusive mostrando a capacidade desse fungo em induzir a liberação de NETs por neutrófilos humanos, tanto por sua forma de levedura quanto a de hifa<sup>109</sup>. Com a descrição desta liberação de redes em resposta ao fungo, foi verificado também, a capacidade do próprio de escapar destas redes. Assim, as leveduras e hifas de *C. albicans* são capazes de liberar DNase e outras endonucleases para escapar das

NETs<sup>128-130</sup>. Um fato interessante demonstrado por um dos estudos é que as cepas de *C. albicans* que colonizam os indivíduos HIV positivos têm maior potencial de atividade da DNase, em comparação com aquelas isoladas de casos sem HIV<sup>129,131</sup>.

Além dos artigos envolvendo *Candida*, outros fungos foram estudados e suas capacidades de liberarem DNase também foi demonstrada, como pode ser identificado para os fungos *C. neoformans* e *C. gattii*<sup>132</sup>. Já Bentubo et al. (2014), descreveram este mecanismo de escape e sobrevivência em diversas espécies do fungo *Trichosporon*<sup>133</sup>. Estes estudos demonstram que os fungos, assim como outros microrganismos, liberam DNase extracelular para escapar da resposta do hospedeiro representada pelas redes extracelulares, e dessa forma manter sua sobrevivência.

Como já dito anteriormente, foi demonstrado que o *P. brasiliensis* possui capacidade de induzir NETs<sup>48,49,121</sup>. Entretanto, um fato interessante demonstrado em um dos trabalhos, foi a identificação de que a cepa virulenta do fungo (Pb18) poderia estar induzindo NETs mais frouxas e delicadas, quando comparadas à cepa avirulenta (Pb265). Foi lançada então, a hipótese de que a cepa virulenta poderia estar liberando uma DNase-like, como mecanismo de escape da defesa do hospedeiro. Esta proteína degradaria o DNA presente nas redes, permitindo a sobrevivência do fungo nos tecidos<sup>45</sup>.

Desjardins et al. (2011) utilizando análises genéticas e técnicas de sequenciamento, conseguiram realizar o sequenciamento de todo o genoma do Pb18 e do *P. lutzi*, que estão presentes no genbank sob identificação ABKI000000000.2, e ABKH000000000.2 respectivamente<sup>134</sup>. Buscando possíveis genes que pudessem estar envolvidos com a produção de deoxiribonucleases pelo fungo, foi identificado possíveis regiões codificadoras de duas proteínas hipotéticas (PADG\_11161 - Gene ID: 22587058 e PADG\_08285 - Gene ID: 22586608) com atividade de DNase no genoma do fungo Pb 18 (ABKI000000000.2), e do *P. lutzi* (ABKH000000000.2), pertencente ao complexo de espécies *Paracoccidioides*, um gene de desoxiribonuclease hipotética (PAAG\_07587 – Gene ID: 9093585)<sup>49,134</sup>.

Sabendo-se que a PCM é uma doença pulmonar de extrema gravidade e importância clínica em nosso país, e que o mecanismo de escape das NETs por meio da produção de DNase seria importante para a sobrevivência do fungo no organismo, estudos para identificar esta proteína e seu papel no mecanismo de escape

das NETs são fundamentais para a melhor compreensão dessa interação do patógeno com o hospedeiro.

## 2. Referências

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(2):89-117.
2. Coutinho ZF, Silva Dd, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica. 2002; 18(5):1441-54.
3. Restrepo A, Tobón, AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier; 2005 p.3062-8.
4. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol. 2013; 8(9):1177-91.
5. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. An Bras Dermatol. 2013; 88(5):700-11.
6. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol. 2006;23:65–73
7. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phylogenet Evol. 2009;52:273–83.
8. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Bras Med. 1908; 22:21-4.
9. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. Fungal Genet Biol. 2017; 106:9-25.
10. Franco M. Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 1987; 25:5–18.
11. Farias MR, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco SMG, Muro MD, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques SA, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. Mycopathologia. 2011; 172: 147-152
12. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, Itano EM, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. Mycopathologia. 2008; 165: 367-371.

13. Fernandes GF, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol*. 2004; 42: 363-368.
14. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griesse J, Theodoro RC, Macoris SAG, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PMS, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008; 46: 35–40.
15. Suguiura IMS, Macagnan R, Omori AM, Buck EL, Scarpassa JA, Pretto-Giordano LG, Vilas-Boas LA, de Camargo ZP, Itano EN, Ono MA. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. *Med Mycol*. 2019; 0:1–7.
16. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AR, Moretti MA. II Consenso de paracoccidioidomicose. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2018;27: e0500001.
17. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol*. 2000; 38(3):185-91.
18. Theodoro RC, Candeias JM, Araújo JP Jr, Bosco Sde M, Macoris SA, Padula LO, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol*. 2005; 43(8):725-9.
19. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007; 7:92.
20. da Silva Neto BR, Carvalho PF, Bailão AM, Martins WS, Soares CM, Pereira M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides spp.* In response to itraconazole. *BMC Genomics*. 2014;15:254.
21. Wanke B, Aidê MA. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. *J Bras Pneumol*. 2009;35(12)
22. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 2002; 40(3):225-42.
23. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002; 4:139-144.
24. Canteros CE. PARACOCIDIOIDOMICOSIS: CRÓNICA DE UNA ENFERMEDAD OLVIDADA. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2018; 78: 180-184.
25. Armstrong-James D, Brown GD, Netea MG et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17:393–402.

26. Mendes RP, de Souza Cavalcante R, Marques SA et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol J.* 2017; 11:224– 282.
27. Funari M, Kavakama J, Shikanai-Yasuda MA, et al. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis): high-resolution CT findings in 41 patients. *AJR.* 1999;173:59– 64.
28. Azenha MR, Caliento R, Brentegani LG, de Lacerda SA. A retrospective study of oral manifestations in patients with paracoccidioidomycosis. *Braz Dent J.* 2012; 23(6): 753-757
29. Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004;204-21.
30. Martinez, R., & Moya, M. J. Complexo primário da paracoccidioidomicose e hipereosinofilia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2009; 35(12):1259–1262.
31. Mendes RP. Quadro Clínico. In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia 5ª Edição.* Rio de Janeiro: Atheneu; 2015 p.1695.
32. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibits mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46(2):346-53.
33. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE. *Imunologia das infecções.* Uberaba: FUNEPU; 1992 p.15-36.
34. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013;67(5):470-85.
35. Singulani, JL, Galeane MC, Ramos MD, Gomes PC, dos Santos CT, de Souza BM, et al. Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. *Frontiers in Cel and Infec Microb.* 2019; 9(419):1-11.
36. Marcos CM, Tamer G, de Oliveira HC, Assato PA, Scorzoni L, Santos CT, de Lacorte Singulani J, de Fátima da Silva J, de Almeida R, de Paula E Silva ACA, et al. Down-regulation of TUFM impairs host cell interaction and virulence by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sci Rep.* 2019;9(1):17206.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. *Imunologia celular e molecular – 9ª ed.* Rio de Janeiro: Elsevier. 2019.
38. do Nascimento MP, de Campos Soares AM, Dias-Melicio LA, Parise-Fortes MR, Martins RA, Nakaira ET, et al. Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Mycopathologia.* 2008;166(1):25-33.

39. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO production. *Cell Immunol.* 2010;263(2):196-203.
40. Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, Acorci-Valério MJ, Araujo JP Jr, de Campos Soares AM. Inhibitory effect of PGE 2 on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Med Mycol.* 2012;50:726–34.
41. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007 Feb;45(1):27-33.
42. Nicola AM, Casadevall A, Goldman DL. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol.* 2008;1:313-7.
43. Gardizani TP, Della Coletta AM, Romagnoli GG, Puccia R, Serezani APM, de Campos Soares ÂMV, Dias-Melicio LA. 43 kDa Glycoprotein (gp43) from *Paracoccidioides brasiliensis* Induced IL-17A and PGE2 Production by Human Polymorphonuclear Neutrophils: Involvement of TLR2 and TLR4. *J Immunol Res.* 2019; 2019:1790908.
44. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) and NO effector mechanisms. *Mycopathol.* 2008;166(1):17-23.
45. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006; 44(4):363-8.
46. Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AM. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003;5(2):107-13.
47. Soares AM1, Calvi SA, Peraçoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology.* 2001 Apr;102(4):480-5.
48. Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, de Almeida Balderramas H, Rodrigues DR, Ximenes VF, de Campos Soares ÂM. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. *Immunobiology.* 2016;221(2):228-35.
49. Della Coletta, A.M., Bachiega, T.F., Silva, J.C.Q., Soares, A.M.V.C., De Faveri, J., Marque, S.A., et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentar lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation in vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9 (9), e0004037.

50. Romagnolo AG, de Quaglia E Silva JC, Della Coletta AM, Gardizani TP, Martins ATL, Romagnoli GG, Kaneno R, de Campos Soares AMV, De Faveri J, Dias-Melicio LA. Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*. 2018;61(4):222-230.
51. Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. 2008;165(4-5):223-36.
52. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(2):153-9.
53. Pereira RM, Bucarechi F, Barison Ede M, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46(3):127-31.
54. Silva IC. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory Functions. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. 2015; 7:35-46.
55. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* infect mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol*. 2003;163:583-90.
56. Phillipson M, Kubes P. The Healing Power of Neutrophils *Trends in Immunol*. 2019; 40(7):635-647.
57. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10 (6):427-39.
58. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019;133(20):2178-2185..
59. Liew PX, Kubes P. The neutrophil's role during health and Disease. *Physiol Rev*. 2019;99: 1223–1248.
60. Liu H, Pope RM. Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction. *Rheum Dis Clin North Am*. 2004;30(1):19-39.
61. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17(11):1381-90.
62. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:173-82.
63. Timár CI, Lőrincz AM, Ligeti E. Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch*. 2013;465(11):1521-33.
64. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-11.
65. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.

66. Parker H, Winterbourn CC. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2013;3:424.
67. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(6):642-60.
68. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Serrão Peraçoli MT, Victoriano de Campos Soares AM. Prostaglandin E2 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect.* 2007;9(6):744-7.
69. Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AMVC. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine.* 2008;41(1):48-53.
70. Bannwart CF, Martins RA, Nakaira-Takahashi E, Dias-Melício LA, Soares AM, Peraçoli MT. Interleukin-15 augments oxidative metabolism and fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):866-72.
71. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007;45:27-33.
72. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
73. Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of the lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia.* 1979;67:131-41.
74. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice. *Mycopathologia.* 1992;119:1-9.
75. Defaveri J, Coelho KIR, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Hypersensitivity pneumonitis to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in mice. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:3-104.
76. Svidzinski; T.I.; Estivalet, M.N.; Hubner, M.; Santana, R.G., Fischman O.; Colombo A. L.. *Paracoccidioides brasilienses* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev. Inst. Med. trop.* 1999; 41(5): 279-283.
77. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
78. Urban CF, Nett JE. Neutrophil Extracellular Traps in fungal infection. *Seminars in cell and Develop Biol.* 2019; 89:47-57.
79. Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 2009;1(3):181-93.
80. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophil sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1017-25.

- 81.** Lippolis JD, Reinhardt TA, Goff JP, Horst RL. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;113(1-2):248–55.
- 82.** Palić D, Andreasen CB, Ostojić J, Tell RM, Roth JA. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J Immunol Methods.* 2007;319(1-2):87-97.
- 83.** Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Nadaes NR, Danelli MG, Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 1):259-64.

- 84.** Chuammitri P, Ostojić J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;129(1-2):126-31.
- 85.** Robb CT, Dyrynda EA, Gray RD, Rossi AG, Smith VJ. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nat Commun.* 2014;5:4627.
- 86.** von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(8):775-83.
- 87.** Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Walmsley SR, et al. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol.* 2010;185(5):2968-79.
- 88.** Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett.* 2010;10(1):59-63.
- 89.** Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1260-6.
- 90.** Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: a microbial mechanism beyond cell death. *J Parasitol Res.* 2012;2012:ID929743.
- 91.** Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 2013;3:420.
- 92.** Scheb-Wetzel M, Rohde M, Bravo A, Goldmann O. New insights into the antimicrobial effect of mast cells against *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2014;82(11):4496-507.
- 93.** Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 2007;204(4):793-804.
- 94.** Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.
- 95.** Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.

96. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117(3):953-9.
97. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(3):277-84.
98. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*. 2014;8(3):883-96.
99. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-41.
100. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463-9.
101. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122(16):2784-94.
102. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010;185(12):7413-25.
103. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009;16(11):1438-44.
104. Gray RD, Lucas CD, Mackellar A, Li F, Hiersemenzel K, Haslett C, et al. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of neutrophil extracellular traps. *J Inflamm (Lond)*. 2013;10(1):12.
105. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem*. 2013;114(3):532-40.
106. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114(13):2619-22.
107. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*. 2012;91(3):369-76.
108. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6748-53.

- 109.** Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668-76.
- 110.** Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, et al. Cell-wall anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. *PLoS One.* 2014;9(8):e103125.
- 111.** Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89(1):29-37.
- 112.** McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 2010;12(12-13):928-36.
- 113.** Malachowa N1, Kobayashi SD, Freedman B, Dorward DW, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 2013;191(12):6022-9.
- 114.** Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, et al. Extracellular DNA traps promotes thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-5.
- 115.** Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2013;1(4). doi: 10.1016/j.jvsv.2012.12.002.
- 116.** Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol.* 2013;4.pii:139.
- 117.** Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol.* 2012;188(7):3522-31.
- 118.** Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 2011;187(1):490-500.
- 119.** Byrd AS, Carmona-Rivera C, O'Neil LJ, Carlucci PM, Cisar C, et al. Neutrophil extracellular traps, B cells, and type I interferons contribute to immune dysregulation in hidradenitis suppurativa. *Sci Transl Med.* 2019;4;11(508).
- 120.** Rocha JD, Nascimento MT, Decote-Ricardo D, Côrte-Real S, et al. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Sci Rep.* 2015;26;5:8008.

121. Mejía SP, Cano LE, López JA, Hernandez O, González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. 2015;161(5):1008-17.
122. Nishino T, Morikawa K. Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. *Nature Oncogene*. 2002; 21:9022-9032.
123. Hoppenbrouwers T, Sultan AR, Abraham TE, et al. Staphylococcal Protein A is a key factor in Neutrophil Extracellular Traps formation. *Front Immunol*. 2018;9:165.
124. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun*. 2010;2:576–586.
125. Gondara S, Higuchi H, Nishi K, Iwano H, Nagahata H. *Mycoplasma bovis* escapes bovine neutrophil extracellular traps. *Veterinary Microbiology*. 2017;199:68-73.
126. de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Köckritz-Blickwede M, Baums CG.. *Streptococcus suis* DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology*. 2014; 160:385–395.
127. Buchanan JT et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Current biology*. 2006; 16:396–400.
128. Zhang X, Zhao S, Sun L, Li W, Wei Q, Ashban RB, Hu Y. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *Am J Transl Res*. 2017;9(1):50-62.
129. Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Roder DVDB, Pedroso RS. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Archives of Oral Biology*. 2016;66:61–65.
130. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida spp.* isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *Journal de Mycologie Médicale*. 2013;23(2):113-118.
131. Campos-Garcia L, Jimenez-Valdes RJ, Hernandez-Bello R, Palma-Nicolas J, Gonzalez GM, Sanchez-Gonzalezocio A. *Candida albicans* and non-albicans Isolates from Bloodstream Have Different Capacities to Induce Neutrophil Extracellular Traps. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(2).
132. Sánchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2010;27:10-13.

- 133.** Bentubo HDL, Gompertz OF. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. Springer Plus. 2014;3:377.
- 134.** Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. PLoS Genet. 2011;7(10):1-16.

*Capítulo 2*  
*Artigo Científico*

## Fungal DNase: a scape mechanism of NETs released in response to *Paracoccidioides brasiliensis*

Yohan Ricci Zonta<sup>1</sup>, Ana Laura Ortega Dezen<sup>1</sup>, Amanda Manoel Della Coletta<sup>1</sup>, Kaio Shu Tsyr Yu<sup>1</sup>, Larissa Carvalho<sup>1</sup>, Leandro Alves dos Santos<sup>2</sup>, Igor de Carvalho Deprá<sup>3</sup>, Lori Zbytnuik<sup>4</sup>, Rachel Kratofil<sup>4</sup>, Michelle Newton<sup>4</sup>, Paul Kubes<sup>4,5,6</sup>, Valdecir Farias Ximenes<sup>7</sup>, Luciane Alarcão Dias-Melicio<sup>1,2,8\*</sup>

<sup>1</sup> São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, UNIPEX - Experimental Research Unity, Sector 5, Botucatu/SP - Brazil;

<sup>2</sup> São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Confocal Microscopy Laboratory, UNIPEX - Experimental Research Unity, Botucatu/SP - Brazil;

<sup>3</sup> São Paulo State University (UNESP), Laboratory of Genetic Basis of Endocrinological diseases, Experimental Research Unity (UNIPEX), Sector 5, Botucatu/SP - Brazil;

<sup>4</sup> Calvin, Phoebe, and Joan Snyder Institute for Chronic Diseases, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada;

<sup>5</sup> Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada;

<sup>6</sup> Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada;

<sup>7</sup> São Paulo State University (UNESP), Sciences School, Department of Chemistry, Bauru/SP - Brazil

<sup>8</sup> São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Department of Pathology, Botucatu/SP – Brazil.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* **E-mail:** ladiasmelicio@fmb.unesp.br

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a systemic fungal disease, considered endemic in Latin America, especially in Brazil, Venezuela, and Colombia. Its etiological agents, fungi of the *Paracoccidioides* complex, have restricted geographic habitat, conidia as infecting form, and thermo-dimorphic characteristics. The infection occurs via inhalation of the infecting conidia, leading to a severe immune response in the lungs and, depending on the clinical form, dissemination to other organs. Neutrophils (PMNs) are responsible for an important defense response, releasing NETs (Neutrophil Extracellular Traps), which can wrap and destroy the yeasts. However, it has been described that some pathogens are able to escape from these DNA structures by releasing DNase as a virulence factor. As different NETs patterns have been identified in PMNs cultures challenged with different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, we seek to evaluate if this differences in the conformation of NETs would be related to the capacity of such strains to produce DNase, or a DNase-like protein, with similar DNase activity, which would have the ability to degrade the NETs. Thus, the general objective of this study was to identify if different patterns of NETs released by human PMNs challenged with Pb18 (virulent) and Pb265 (avirulent) strains would be correlated with fungal ability to produce DNase. To this end, PMNs from healthy subjects were isolated and challenged *in vitro* with both fungal strains. The production, release, and conformation of NETs in response to the fungi were evaluated by Confocal Microscopy, Scanning Microscopy, and NETs Quantification. The identification of fungal DNase production was assessed by DNase TEST Agar, and the relative gene expression for hypothetical proteins was investigated by RT-qPCR, whose genes had been identified in the fungal genome in the GenBank (PADG\_11161 and PADG\_08285). It was possible to verify the NETs release by PMNs, showing different NETs formation when in contact with different strains of the fungus. The Pb18 strain induced the release of looser, larger, and more looking like degraded NETs compared to the Pb265 strain, which induced the release of denser and more compact NETs. DNase TEST Agar identified the production of a DNase-like protein, showing that only Pb18 showed the capacity to degrade DNA in the plates. Besides that, we were able to identify that both PADG\_08528 and PADG\_11161 genes were more expressed during interaction with neutrophil by the virulent strain, being PADG\_08528 highly expressed in these cultures, demonstrating that this gene could have a greater contribution to the production of the protein. Thus, we identified that the virulent strain is inducing some loose and degraded NETs, probably by releasing a DNase-like protein. This factor could be an important escape mechanism used by the fungus to escape the NETs action.

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis; Neutrophils; NETs; DNase

## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal disease, considered endemic in Latin America, occurring from Mexico to Argentina with its main foci of infection in countries such as Brazil, Venezuela, and Colombia, usually affecting agricultural workers, gardeners, and transporters<sup>1-4</sup>. Some cases have been reported outside the endemic areas, such as Europe and North America, but in these cases, the infected individuals moved to these regions after infection occurred<sup>5</sup>. It is considered a neglected disease as it largely affects the lowest social strata in developing countries. Its etiological agents are fungi from the *Paracoccidioides* complex, composed of 5 cryptic species that have restricted geographic habitat, conidia as infecting form and thermo-dimorphic characteristics, which means that it alters its morphology according to the temperature to which it is exposed, taking the form of mycelium at room temperature, and after entering the human body and coming in contact with body temperature (37°C), it turns into yeast form<sup>3</sup>. The fungus *Paracoccidioides* spp. belongs to the same family as other etiological agents that cause deep fungal mycoses<sup>6</sup>. All members of the *Ajellomycetaceae* family (*Onygenales* Order)<sup>7</sup> have the same infectious form (conidia), as well as a restricted geographical habitat and the same thermodimorphic characteristics<sup>3,8-10</sup>. A recent study used molecular polymorphism, phylogenetic reconstruction, genetic and morphological population analysis of yeasts and conidia of different species demonstrated that the *Paracoccidioides* complex (previously known as *P. lutzii* and four cryptic species of the *P. brasiliensis*) can actually be divided in some very different species, and with that, proposed a new nomenclature for these different agents: *P. americana* for PS2, *P. restrepiensis* for PS3, and *P. venezuelensis* for PS4, while *P. brasiliensis* would be restricted to species S1<sup>6,11,12</sup>.

After inhalation, the infectious conidia are lodged in the terminal part of the pulmonary airways (bronchioles and alveoli)<sup>12,13</sup>, where, due to body temperature, they become yeast and form the so-called Primary Pulmonary Complex<sup>14</sup>. According to the characteristics of the patient, their immune response capacity, and the inherent characteristics of the fungus, different response outcomes can be observed. The first

would be the heal, in which the patient's immune system is strong enough to fight the fungus, not allowing the disease to develop and spread, characterizing PCM-infection<sup>15</sup>. This first outcome can be identified through a positive delayed-type hypersensitivity skin test (DTH) using the paracoccidioidin antigen. The fungus can also become latent and spread to other organs such as the liver, spleen, adrenal via the lymphohematogenous pathway, characterizing PCM-disease<sup>8</sup>, which can be presented in two different forms, the acute/subacute and the chronic forms<sup>12,16</sup>.

*Paracoccidioides* mainly affect the lungs and may also spread to phagocytic-mononuclear system organs, mucous membranes, and integument, leading to the formation of granulomatous lesions, characterized microscopically by the presence of fungi, mononuclear defense cells (lymphocytes and macrophages), and polymorphonuclear cells (neutrophils), as well as epithelioid cells and multinucleated giant cells, known as Langhans cells<sup>12</sup>. The acute/subacute form represents 3 to 5% of PCM cases, being more common in childhood, adolescence, and early adulthood. The fungus spreads to the whole body, causing lymph node enlargement, hepatosplenomegaly, and other symptoms that lead to severe and rapid impairment<sup>12</sup>. The chronic form is more frequent, representing more than 90% of the cases, being more common in adult men, and characterized by the formation of granuloma in the lungs. The disease can affect only the lungs, being called unifocal, or it can affect other tissues, such as spleen, liver, and lymph nodes, being called multifocal<sup>12,17</sup>. In women, the development of paracoccidioidomycosis as chronic clinical manifestations of the disease are rarer because the fact that the fungus could not reach its yeast form inside the body, due to the mechanism related to the presence of estrogen, which eventually prevents this transformation<sup>10</sup>.

As several individuals become infected every year with *Paracoccidioides* complex agents, which are identified by intradermal testing as previously mentioned, and few patients have clinical manifestations, it is possible to state that an efficient innate immune response added to the development of an adaptative immune response with resistance profile are extremely important to the fight against fungus<sup>18,19</sup>. In animal models, it has been shown that in the early stages of infection, an acute

inflammatory process is triggered, with the involvement of mostly phagocytic cells such as neutrophils and macrophages<sup>20</sup>.

Human neutrophils are associated with resistance to *P. brasiliensis* infection *in vitro*, as polymorphonuclear cells can ingest the fungal yeast through the phagocytosis process<sup>21</sup>. However, when the yeasts are larger than the supported size by the cell, the cells generate an extracellular vacuole before attacking the fungus<sup>20</sup>. However, although some times neutrophils are successful in the phagocytosis process, this does not seem to be sufficient to kill the fungus<sup>21</sup>.

Some studies have shown that human neutrophils have no fungicidal or fungistatic activity against *P. brasiliensis*<sup>21, 22</sup>. This activity, however, is increased when cells are activated by IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, or Reactive Oxygen Species (ROS), which initiates an offensive mechanism against the fungus dependent on ROS<sup>23</sup>. However, studies indicate that specific cytokines, such as IL-10, also act as suppressors of polymorphonuclear mediated response<sup>24</sup>.

In contrast, in recent years, it has been shown that neutrophils have a new defense mechanism, called NETs (Neutrophil Extracellular Traps), that is extracellular traps, composed of large amounts of DNA, associated with neutrophil cytoplasmic granule contents, such as enzymes, histones, and antimicrobial peptides<sup>25-30</sup>. The high concentration of these components in NETs, associated with the physical structure created around the microorganism, are directly associated with the antimicrobial activity of these structures<sup>25,27-30</sup>.

Recently, it was demonstrated that *P. brasiliensis* could induce the release of NETs<sup>31,32,33</sup>. A study identified that the virulent fungal strain (Pb18) is able to induce the release of NETs by human neutrophils from healthy individuals, that recognize the fungus via the dectin-1 receptor, besides demonstrating that these released structures are also involved with the extracellular fungicidal activity of these cells<sup>32</sup>. Another study identified the presence of NETs in cutaneous lesions of patients with PCM, as well as evaluating the neutrophil response of these individuals *in vitro* when challenged with two different strains of the fungus, the Pb 18 (more virulent) strain, and Pb 265 (less virulent) strain<sup>33</sup>. The results showed that after

the contact of cells with yeasts of the two different strains, it was possible to identify the formation of different patterns of NETs<sup>33</sup>. The study hypothesized that the different results found for the different strains could be associated with the capacity of each fungal strain, especially the most virulent strain (Pb18), to present a mechanism already identified for other microorganisms<sup>33</sup>, which would be DNase enzyme production, as a mechanism of fungal escape from host defenses, which could lead to degradation and reduction of the effectiveness of NETs functions in the human body<sup>25</sup>.

The identification of this enzyme production by different fungal strains in human neutrophil cultures, and the possible correlation of this protein with the different patterns of NETs already identified in neutrophil cultures in early study<sup>32</sup>, would be fundamental and extremely important to prove the hypothesis raised, and thus better understand the fungal mechanisms involved in the escape of host defenses. Therefore, the general objective of this study was to identify in human neutrophil cultures challenged with strains Pb18 and Pb265, the presence of a fungal DNase or a protein-like with the same activity, and correlate it with different NET patterns induced by different strains.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### - Casuistics

Neutrophils were obtained from 40mL of peripheral blood after venipuncture of 10 healthy volunteers. All subjects were informed of the research goals and signed a consent form. The study was conducted according to the National Health Guidelines 196/96, and it was approved by the Research Ethics Committee of Medical School of Botucatu, UNESP – São Paulo State University (CAAE: 85654018.9.0000.5411; protocol: 2.577.243/2018).

### - Neutrophil isolation

After the venous puncture, neutrophils were isolated by a density gradient centrifugation (Histopaque® 1119g/mL and Histopaque® 1083g/mL - Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA) at 1500 rpm for 30 minutes (room temperature). Erythrocytes were lysed with a hypotonic solution (NaCl 0.1%), and the neutrophil viability was assessed with trypan blue dye exclusion (95% viability). Cell cultures were then resuspended in RPMI-1640 medium (Cultilab – Campinas, São Paulo, BRA) supplemented with 10% of calf serum (Sigma-Aldrich) and 1% Gentamicin (Schering-Plough, New Jersey, EUA) and adjusted for  $2 \times 10^6$  cells/mL before all procedures.

### - Fungal strains and culture conditions

Two strains of *P. brasiliensis* were used during the experiments: Pb18, a virulent strain, and Pb265, a non-virulent strain. Strains were cultivated in GPY agar (BD - Franklin Lakes, New Jersey, USA) and incubated at 37°C for six days. After the growing period, a sample was collected and diluted in RPMI-1640 (Cultilab) medium in a tube containing glass beads. The tubes were vortexed to separate de buds from the mother cells, and after sedimentation for 5 minutes, the supernatant with smaller yeasts was collected. After that, the fungi were counted in a Neubauer chamber to verify the cell concentration and viability by the phase-contrast method<sup>34</sup>. The fungus concentration was adjusted to  $4 \times 10^4$  cells (1:50 ratio).

#### - **Immunofluorescence for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) visualization**

Isolated neutrophils (500µL/well) from healthy volunteers adhered to coverslips treated with Poly-L-Lysine 0, 01% (Sigma-Aldrich) in 24-well bottom for adherence. Cells were then challenged with 500µL/well from *P. brasiliensis* (Pb18 and Pb265) for 2 hours at 37°C in 5% of CO<sub>2</sub>. Some cultures were treated with 250µL of PMA (Sigma Aldrich, 100ng/mL) as a positive control, and some wells were treated with 250ul of DNase (Thermo-Fisher, 100U/mL), as a negative control. Cocultures were then fixed with PBS+BSA (bovine serum albumin)+PFA (paraformaldehyde) 2% and incubated with PBS+BSA 5% (for nonspecific binding block) for 30 minutes. Anti-neutrophil elastase (Calbiochem – Merck Millipore - Burlington, Massachusetts, USA) and anti-histone H1 (Merck Millipore) primary antibodies were added to the coverslips for 1 hour at 37°C. Cultures were washed three times with PBS and incubated with anti-rabbit-FITC (Millipore) and anti-mouse-Texas red (Calbiochem – Merck Millipore) secondary antibodies for elastase and histone visualization. Mounting medium for fluorescence with DAPI was used to mount the slides (Vectashield-Vector Labs, Burlingame, California, USA). Confocal images were taken in a Leica TCS SP8 from Confocal Microscopy Laboratory, UNIPLEX - Experimental Research Unity, FMB-UNESP, Botucatu. The images were further analyzed using IMARIS® software (Oxford Instruments) at Calvin, Phoebe, and Joan Snyder Institute for Chronic Diseases, University of Calgary / CA. The total area and intensity of the NETs were analyzed using the images of cultures challenged with Pb18 and Pb265, with the analysis of the elastase staining.

#### - **Neutrophil Extracellular Traps (NETs) by scanning electron microscopy**

Neutrophils cultures ( $2 \times 10^6$  cells/mL) underwent 2 hours of adherence on coverslips treated with Poly-L-Lysine 0,01% (Sigma-Aldrich) in 24-well bottom plates before fungal challenge or activation with PMA. Some cultures were treated with DNase (100U/mL– Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, USA) as a negative control. After 2 hours of challenge, supernatants were removed, and cultures were fixed with 2.5% of glutaraldehyde for scanning electron microscopy analysis at

CME (Electron Microscopy Center – Institute of Bioscience — UNESP— Botucatu). The analyses were performed under a scanning microscope FEI Quanta 200 model from the same lab above.

#### - **Neutrophil Extracellular Traps (NETs) quantification**

Supernatants of neutrophils cultures challenged with Pb18, and Pb265 strains were collected for NETs quantification by an immunoassay using anti-elastase (colocar referência do produto) and Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen - Carlsbad, Califórnia, USA) according to the manufacturer's instructions, with some adaptations<sup>35,36</sup>. Some cultures were treated with PMA or DNase, as positive and negative controls, respectively. Briefly, anti-elastase (5µg/mL) antibody (Calbiochem – Merck Millipore) was used to coat a 96-well clear-bottom black plate (Corning - Corning, Nova York, EUA) overnight at 4°C. Supernatants were then settled to the plate, and the extracellular DNA bounded to the elastase, a NET constituent, was measured with Quant-iT™ PicoGreen® kit. Samples were analyzed by fluorescence intensity (excitation at 488 nm and emission at 525 nm wavelength) by a FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA), and concentrations were calculated comparing to a standard curve using known levels of DNA.

#### - **DNase Test Agar**

To identify the possible DNase-like production, with an extracellular deoxyribonuclease activity, we utilized a DNase Test Agar (Acumedia, Neogen Culture Media) supplemented with 0,5% gentamicin sulfate (80mg/2mL, Novafarma) at 10mg/mL and 5% fungal aqueous extract (obtained from our Pb192 strain). Petri plates (90x15 mm) were filled with 25ml of medium and were incubated for one day before the experiment to exclude any contaminated plate. Each of the  $4 \times 10^4$  cells/ml fungal suspension was diluted until  $4 \times 10^3$  cells/mL and had 100µL plated using an L-shaped glass rod. The plates were flooded with HCl 1N to precipitate the DNA, after 14 days of incubation, then a halo around the colonies with some deoxyribonuclease activity was revealed. As a positive and negative control, *Staphylococcus aureus* and

*Saccharomyces cerevisiae*, respectively, were also plated in the DNase Test Agar medium, showing the effectiveness of the method in identifying positive DNase colonies.

#### - Reverse Transcription qPCR

To verify the gene expression related to a possible DNase-like production, we performed a RT-qPCR to verify the mRNA expression of two potential genes related, PADG\_11161 and PADG\_08285, according to GenBank. At first, 2 mL of neutrophil cultures were challenged with both strains of *P. brasiliensis* as previously mentioned, in the periods of zero and two hours of incubation at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were lysed with TRI Reagent® RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) and the mRNA was extracted utilizing the Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit according to the manufacturer's instruction (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). The mRNA samples were treated with DNase I, RNase free (Thermo Fisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, EUA) and a ribonuclease inhibitor (Thermo Fisher Scientific) and then transformed into cDNA by reverse transcription using the High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™, Foster City, Califórnia, EUA). The qPCR was performed on the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) with LUNA™ Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, EUA). The hypothetical sequences responsible for the deoxyribonuclease production were obtained from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and the primers, designed on Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). There were two hypothetical sequences on *P. brasiliensis* genome that could be responsible for DNase release: PADG\_11161 and PADG\_08285 (Access codes NW\_011371358.1 and NW\_011371372.1)<sup>33,37</sup>. The positive control was a fungal rRNA region (rRNA 5,8S). The primers were synthesized by Thermo Fisher Scientific – Brazil. The qPCR from isolated neutrophil cultures was not performed as the presence of fungal primer sequences in the human genome was verified by GenBank, and no match was found. *P. lutzii* hypothetical regions for DNase expression PAAG\_12429 and PAAG\_07101 (Access code XM\_015847918.1 and XM\_002790819.1) were also tested in Pb18 and Pb265 samples, but no expression was detected (Annex 2).

### - **Statistic**

All data were firstly tested by the Shapiro-Wilk normality test. Extracellular DNA quantification was analyzed by the Friedmann test, followed by the posttest of the multiple Dunn comparisons. Imaris analysis was tested by the Mann-Whitney test for fluorescence Intensity and paired T-test for Area. PCR analysis was performed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's Test. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.01 Software (GraphPad Software INC., CA, USA) with a significance value set at  $p < 0,05\%$ .

## **RESULTS**

### - **Scanning microscopy of neutrophil cultures challenged with Pb18 and Pb265 strains**

PMN cultures were challenged over 2 hours, with two different strains of *P. brasiliensis*, Pb18 and Pb265, and PMA as a positive control, and were analyzed by electronic scanning microscopy. The images demonstrated that there were two different patterns of NETs for the two different strains of the fungus (Figure 1 and 2).

Neutrophil cocultures challenged with the Pb18 strain showed larger, looser, delicate, diffuse networks than NETs induced by Pb265, which covered most of the analysis area, consistent with a less effective structure in fungal entrapment, as can be identified in Figure 1 and 2, respectively.

Figure 2 represents the NETs released in response to strain Pb265. Unlike NETs released in response to the virulent strain (Pb18), the NETs found in cultures challenged with the avirulent strain were much more compact and denser, more localized, promoting higher yeast entrapment, as can be seen in the images.

The control experiments demonstrated that DNase treatment was able to degrade the networks formed in response to *P. brasiliensis* and PMA (used as a positive control of induction of NETs). Thus, Figure 3 is showing the absence of the structures in the slides, which were degraded by the action of DNase added in the cultures. It can also be observed some residues present in the slides, possibly from components present in the NETs, other than DNA, due to the degradation.

- **Confocal microscopy of neutrophil cultures challenged with Pb18 and Pb265 strains**

The presence of NETs and their components were evaluated by confocal microscopy. Nuclear DNA and extracellular deconcentrated DNA were labeled with DAPI (Fig. 4A). Elastase and histones, other major components of NETs were also identified, combined with decondensed DNA, after immunostaining with specific primary and secondary antibodies (Figs.4B and 4C). And, as expected, Fig. 4D demonstrate the overlap of the three stainings, thus characterizing the presence of NETs in neutrophil cultures challenged with the avirulent fungal strain (Pb265). Figure 5 and 6 shows a dense, localized network with very intense elastase immunostaining. It also caught our attention, the presence of fungi staining with DAPI and Anti-histone, allowing the identification of several fungi trapped in the formed NETs.

By analyzing the slides of cultures challenged with Pb18, it was possible to see differences regarding the spatial arrangement and fluorescence intensity of these Pb18-induced NETs compared to Pb265-induced NETs. The virulent strain Pb18 (Fig. 5) induced the formation of a visually more extensive, more dispersed, looser and delicate network with lower fluorescence intensity compared to the strain Pb265 (Fig. 4), whose induced denser, more compact, and with higher fluorescence NETs, as seen by scanning microscopy.

Interestingly, DNA and histone staining (DAPI and Texas RED) marked the yeast, although no specific fungal labeling was used. This fact could suggest that in cultures challenged with Pb265 the number of yeasts trapped in NETs is much higher than in cultures challenged with Pb18.

#### **- NETs quantification in neutrophil cultures challenged with Pb18 and Pb265**

The quantification of NETs was done using a specific immunoassay, in which a 96-well plate was treated with an anti-elastase antibody, thus allowing the quantification of the extracellular DNA-elastase complex, an important constituent of NETs. The Quant-iT™ PicoGreen® kit was used to evaluate and to quantify these complexes. Samples were analyzed for fluorescence intensity, and concentrations were calculated from a standard curve using known DNA concentrations. Thus, supernatant from PMA-stimulated neutrophil cultures (a potent inducer of NETs - positive control) or challenged with Pb18 or Pb265 were evaluated. DNase-treated cultures were used as a negative control to assess the degradation of NETs.

The results demonstrated that PMA-treated cultures had a significant increase in the concentrations of NETs present in the cultures compared to normal neutrophils (Figure 6). These values were significantly decreased when cultures were stimulated with PMA and treated with DNase, demonstrating that quantification was useful in identifying the increase in induction of NETs by PMA, and also decreased structures when stimulated cultures were also treated with DNase, which promoted the degradation of the NETs.

The results regarding the quantifications of cultures challenged with Pb265 and Pb18 corroborate the data presented so far, demonstrating that the Pb265 strain induced a large amount of NETs compared to neutrophil-only or Pb18-challenged cultures (Fig. 7). The levels of NETs in cultures challenged with Pb18 demonstrate levels similar to normal neutrophil cultures and could indicate a low capacity to induce NETs or the action of a DNase that would act on virulent strain-induced NETs.

- **NETs fluorescence intensity and area quantification by IMARIS<sup>®</sup> software**

To evaluate the fluorescence intensity and area of NETs induced by the virulent and avirulent strains of the fungus (Pb18 and Pb265, respectively), the confocal images were evaluated by the IMARIS<sup>®</sup> software. Analyzes showed that NETs released in response to the avirulent strain were much more intense (fluorescence intensity) than those released in response to the virulent strain. However, the area of NETs was larger in virulent strain images (Figure 8), although the results did not show statistical differences between the two strains.

- **DNase production by fungi evaluated by DNase test agar**

To assess the production and release of a possible DNase by the virulent and avirulent strains of the fungus (Pb18 and Pb265, respectively), DNase Test Agar was used. *S. aureus* and *S. cerevisiae* were used as positive and negative control, respectively (Figure 9). The images made with the virulent strain Pb18 demonstrated the degradation of the DNA present in the medium, leading to the formation of a halo around the fungal colonies. Because of the halos coalesced, we can spot a translucent area (Figure 10). The red line marks the halo boundaries.

Cultivating the avirulent strain in the DNase test agar medium, the images showed that the Pb265 strain (Figure 11) was not able to produce a halo as consistent and intense as the virulent strain (Pb18). This may be associated with the fact that the virulent strain is able to produce and release a DNase-like protein, that could be involved in the degradation of NETs.

- **DNase expression evaluation by RT qPCR**

To evaluate the gene expression over time for each strain, we performed a RT-qPCR. Pb18 and Pb265 were analyzed for both genes (PADG\_11161 and PADG\_08285) in isolated cultures and in PMN-fungus challenged cultures for 2 hours.

The Pb18 strain demonstrated a much higher relative expression of the PADG\_08285 gene after 2 hours of a challenge when compared to the expression of the gene in the culture of isolated yeasts, close to 15 times higher. The Pb265 strain

also showed an increase in the relative expression of this gene after 2 hours of challenge, higher than the isolated cultures. Therefore, the virulent strain demonstrated a much higher expression of the gene than the avirulent strain (fig.12 A).

The PADG\_11161 gene demonstrated higher relative expression in cultures of neutrophils challenged with both strains than in isolated fungi cultures, whereas in cultures challenged with the virulent strain, the expression was higher than controls and cultures challenged with the avirulent strain (Fig. 12 B).

## DISCUSSION

The action of NETs is widely studied nowadays<sup>27-30</sup>. Studies have shown that when the pathogen is too large to be phagocytized, neutrophils respond to releasing NETs by the process known as NETosis<sup>38</sup>. Other studies have already presented several microorganisms as NETs inducers, such as *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leishmania amazonensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* and *P. brasiliensis* itself, some of these studies even showing microbicidal activity<sup>25-32, 39-42</sup>.

The interaction between *P. brasiliensis* and NETs is still being investigated, but a study has already shown the production of NETs in contact with *P. brasiliensis* yeast and how these structures are involved in extracellular fungal death, also showing that the dectin-1 receptor mainly mediates the NETs released in response to the *P. brasiliensis* strains<sup>32</sup>.

The NETs released against *P. brasiliensis* have also been demonstrated in cutaneous lesions in patients with paracoccidioidomycosis<sup>33</sup>, corroborating with the previous studies. The same study showed different NETs patterns induced by different strains of the fungus (Pb18 and Pb265), the same pattern seen in the present study.

The Scanning Electron Microscopy assays demonstrated structures similar to those shown in the previous studies<sup>32,33</sup>. In the current results, the release of NETs was evidenced and confirmed by confocal microscopy, where it was observed the presence of extracellular DNA (labeled by DAPI), histones, and elastase (marked by specific antibodies). However, the patterns of the NETs differed from each other according to the fungal strain used. When the most virulent strain (Pb18) was evaluated, the NETs aspect was looser, dispersed, covering most of the coverslips. When the less virulent strain (Pb265) was tested, the NETs were denser, more condensed and covering smaller areas closer to the fungus. These results directly resemble previous studies<sup>33</sup>. The difference between NETs was demonstrated, as well, by the analysis of area and intensity using IMARIS software. The results showed that the intensity of NETs released in response to Pb265 was greater than that released in response to Pb18. These results suggest a lower induction capacity or a possible degradation of the DNA

present in the NETs by the virulent strain, corroborating the hypothesis mentioned by Della-Coletta et al. (2015)<sup>33</sup>, that Pb18 strain could be producing some protein with DNase-like activity and that this protein could be degrading the NETs, acting as an escape mechanism<sup>33</sup>. Some studies have already shown the release of endonucleases by different microorganisms as an escape mechanism for NETs, such as *S. aureus*, a group of *Streptococcus*, and many other microorganisms, such as *C. albicans* e *Cryptococcus*, that can produce DNase to escape from the NETs<sup>43-47</sup>.

The presence of NETs was evaluated and quantified by an immunoassay using anti-elastase and Quant-IT Picogreen Kit. This methodology has already been used in other studies<sup>41,42</sup>. The extracellular DNA quantification was used to assess the NETs release in response to *Mycobacterium tuberculosis*, *L. amazonensis* and other microorganisms as well<sup>48,49</sup>. However, the use of the Picogreen Kit alone, with only extracellular DNA labeling, could be evaluating any extracellular DNA, that can come from both the NETosis process and other cellular phenomena. Thus, we chose to quantify the elastase-extracellular DNA complex by using the anti-elastase antibody. Our results showed that the culture challenged with the virulent strain presented a smaller amount of NETs when compared to the avirulent strain, corroborating the confocal and scanning microscopy results, and the above results.

The release of DNase is very commonly evaluated in microorganisms. Many organisms are capable of releasing DNase to escape from the immune system<sup>43-46,50</sup> and the DNase Test Agar is commonly used in tests to identify *S. aureus*, since this microorganism is a known producer of DNase<sup>50</sup>. In the present study, using this method, it was identified the production of a DNase-like protein by the virulent strain of *P. brasiliensis* (Pb18), demonstrating DNA degradation in the cultures plaques, while the avirulent strain did not demonstrate any significant production. This result refers to the hypothesis made by our previous studies, which showed that the NETs released in response to the virulent strain were looser and had a more degraded appearance when compared to the NETs released in response to the avirulent strain<sup>33</sup>. This leads us to believe that this pattern of NETs occurs due to a release of a protein with DNase-like activity by the virulent strain, as shown by our results, that Pb18 could produce a DNase-like protein, suggesting an action on NETs degradation, which would explain the observed effects.

With the identification of a DNase-like protein action by Pb18 strain, it was tested different genes (PADG\_08528 and PADG\_11161) to hypothetical proteins found in the fungus genome<sup>37</sup>, and it was demonstrated that the PADG\_08528 gene showed much higher expression than the PADG\_11161 gene when yeast cells were challenged with human neutrophils. Interestingly, both genes showed higher expression in Pb18 yeast challenged cultures. This demonstrates that both genes may be associated with the production and release of a DNase-like, however when these yeasts were placed in contact with human neutrophils, the PADG\_08528 gene had a much larger expression, thus, probably, indicating that this gene could be involved in the release of DNase-like protein and consequent degradation of NETs. These results also corroborated the results presented previously, that the virulent strain (Pb18) would be releasing a DNase-like protein as a way to degrade NETs and survive the neutrophils attack<sup>33</sup>.

Interestingly, although no specific labeling was used for the fungus yeast, we noted that the histone labeling and DAPI itself were able to label *P. brasiliensis* yeasts, enabling the identification of yeasts trapped in the formed NETs. This fact, although not expected, allowed a very interesting observation, demonstrating that in the images related to cultures challenged with Pb265 (fig. 4), there were a much larger number of yeasts that were trapped in the formed NETs, a fact that was not observed in cultures challenged with strain Pb18 (Fig. 5), that is, the presence of trapped fungus was much smaller when compared to cultures challenged with avirulent strain, a phenomenon that could be explained by our results. And another observation is that if the yeasts were labeled with anti-histone, allowing the visualization of the fungus in the images, probably was due to an effect of yeast coverage by histones present on the NETs, or even thought to the damage of the fungus by NETs allowing the access of the antibody.

In conclusion, we can state that the virulent strain (Pb18) is inducing some loose and degraded NETs, probably by the release of a DNase-like protein. This factor could be an important escape mechanism of the fungus to circumvent the action of NETs, thus subverting this important neutrophil effector mechanism. Our lab is conducting other studies to better identify and characterize this protein.

**Acknowledgment**

We thank the CME (Electron Microscopy Center—Biosciences Institute—UNESP—Botucatu) for acquiring the images by Scanning Electron Microscopy and Confocal Microscopy Laboratory from UNIPEX- Medical School of Botucatu – UNESP) for acquiring the images by Confocal Laser Scanning Microscopy.

**Funding:** This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP 2018/09706-7), FAPESP MS fellowship (YRZ - FAPESP 2017/26230-3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

1. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011;49: 785-798.
2. Coutinho ZF, Silva Dd, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 2002; 18(5):1441-54.
3. Restrepo A, Tobón, AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier; 2005 p.3062-8.
4. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. *An Bras Dermatol*. 2013;88(5):700-11.
5. Aguiar JIA, Paniago AMM, Hans-Filho G, Freitas GM paracoccidioidomicose. Aspectos epidemiológicos. Dados preliminares. *Revista de Patologia Tropical*. 1993;22:239-244.
6. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006;23:65–73
7. Hrycyk MF, Garcia Garces H, Bosco SMG, de Oliveira SL, Marques SA, Bagagli E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Med Mycol*. 2018; 56(8):950-962.
8. Franco M. Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:5–18.
9. Araújo MS, Souza SCO. Análise epidemiológica de pacientes acometidos com paracoccidioidomicose em região endêmica do estado de Minas Gerais. *Rev PosGrad*. 2002; 7:22-6.
10. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeasts transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984; 46(2):346-53.
11. Turissini, D.A., Gomez, O.M., Teixeira, M.M., McEwen, J.G., Matute, D.R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol*. 2017;106:9-25.
12. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AR, Moretti MA. II Consenso de paracoccidioidomicose. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2018;27: e0500001.
13. Wanke B, Aidé MA. Curso de Atualização. Micoses. Paracoccidioidomicose. *J Bras Pneumol* 2009;35(9):1245-9
14. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CF. The primary pulmonary lymph node complex in Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1979; 67(2):115-8.
15. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002;4:139.5.

16. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol.* 2013; 8(9):1177-91.
17. Londero AT. Paracoccidioidomicose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J Pneumol.* 1986;(12):41-60.
18. Benard, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathology.* 2008; 165:209–221.
19. González A, Caro E, Munoz C, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE. *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. *Microb. Pathog.* 2008; 44:389–401
20. Dias MF, Filgueira AL, de Souza W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. *Microsc Microanal.* 2004;10, 215–223.
21. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 1999;37:261–267.
22. Kurita N, Oarada M, Brummer E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med. Mycol.* 2005;43:417–422.
23. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MTS, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med. Mycol.* 2007;45:27–33.
24. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peracoli, MTS, et al. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol. Immunol.* 2007;51 (1):73–80.
25. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303:1532–1535.
26. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012;198:773–783.
27. Phillipson M, Kubes P. The Healing Power of Neutrophils *Trends in Immunol.* 2019; 40(7):635-647.
28. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-94.
29. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood.* 2019; 133(20):2178-2185.
30. Liew PX, Kubes P. The neutrophil's role during health and Disease. *Physiol Rev.* 2019;99:1223-1248.
31. Mejía SP, Cano LE, Lopez JA, Hernandez O, Gonzalez A. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology.* 2015;161:1008–1017.
32. Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, de Almeida Balderramas H, Rodrigues DR, Ximenes VF, de Campos Soares ÂM. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. *Immunobiology.* 2016

33. Della Coletta, A.M., Bachiega, T.F., Silva, J.C.Q., Soares, A.M.V.C., De Faveri, J., Marque, S.A., et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentar lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation in vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9 (9).
34. Soares AMVC, Calvi SA, Peracoli MTS, Fernandes AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102:480-485.
35. Colón DF, Wanderley CW, Franchin M, Silva CM, Hiroki CH, Castanheira FVS, Donate PB, Lopes AH, Volpon LC, Kavaguti SK, Borges VF, Speck-Hernandez CA, Ramalho F, Carlotti AP, Carmona F, Alves-Filho JC, Liew FY, Cunha FQ. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Crit Care.* 2019; 23(1):113.
36. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV, Melo PH, Scortegagna GT, Silva RL, Barroso-Sousa R, Souto FO, Pazin-Filho A, Figueiredo F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One.* 2016; 11(2):e0148142.
37. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011;7(10).
38. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1017–1025.
39. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006; 8(4):668–676.
40. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protects *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 2007; 9(5):1162–1171.
41. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaganianda V, Nietzsche S, Thywissen A, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 29; 6(4): e1000873.
42. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009; 114(13):2619–2622.
43. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006; 16(4): 396–400.
44. Gondara S, Higuchi H, Nishi K, Iwano H, Nagahata H. *Mycoplasma bovis* escapes bovine neutrophil extracellular traps. *Veterinary Microbiology.* 2017;199:68-73.

45. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kückritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun.* 2010;2:576–586.
46. Zhang X, Zhao S, Sun L, Li W, Wei Q, Ashban RB, Hu Y. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *Am J Transl Res.* 2017;9(1):50-62.
47. Sánchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2010;27:10-13.
48. Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009; 89(1):29–37.
49. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva S, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(16):6748–6753.
50. Kateete, D.P.; Kimani, C.N.; Katabazi, F.A.; Okeng, A.; Okee, M.S.; Nanteza, A.; Joloba, M.L.; Najjuka, F.C.. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Manitol Salt Agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2010; 9:23.

## FIGURES

- Figure 1

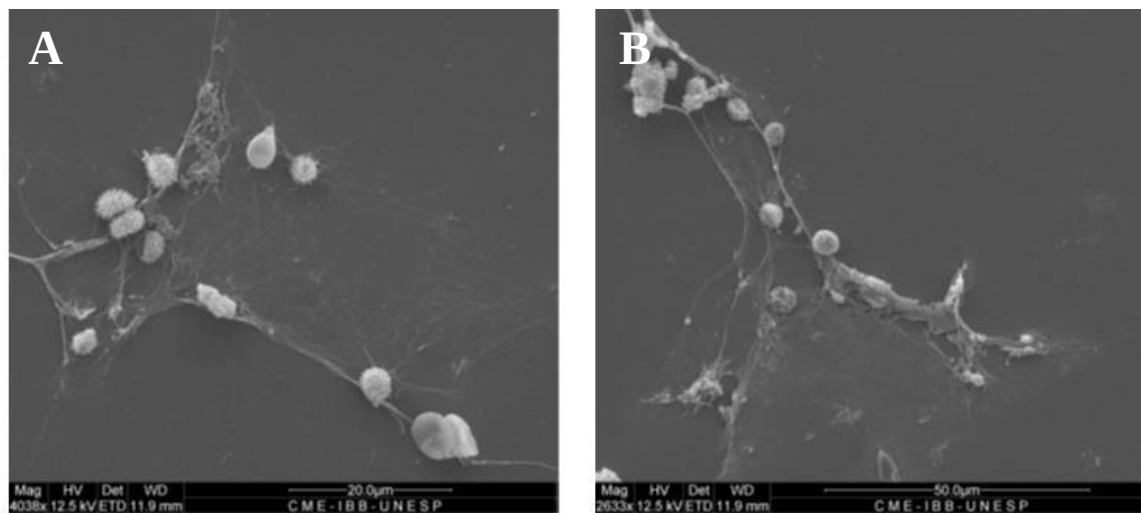


**Fig.1** Scanning microscopy of neutrophil cultures challenged with *P. brasiliensis* strain Pb18, during two hours of incubation at 37 ° C at 5% CO<sub>2</sub>. (A) 4000x zoom, (B) 2650x zoom

- Figure 2

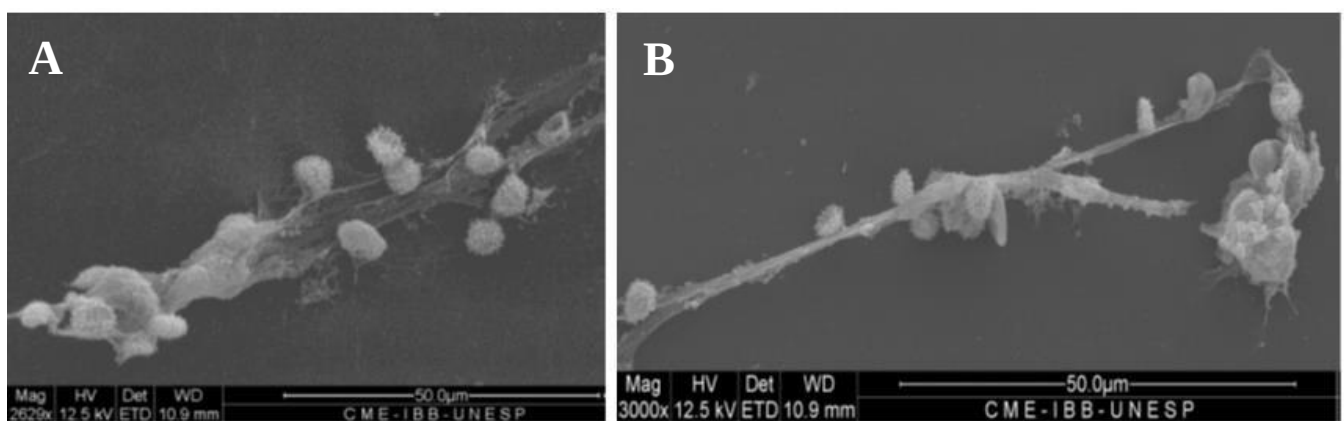


**Fig.2** Scanning microscopy of neutrophil cultures challenged with *P. brasiliensis* strain Pb265, during two hours of incubation at 37 ° C at 5% CO<sub>2</sub>. (A) 2650x zoom, (B) 3000x zoom.

- Figure 3

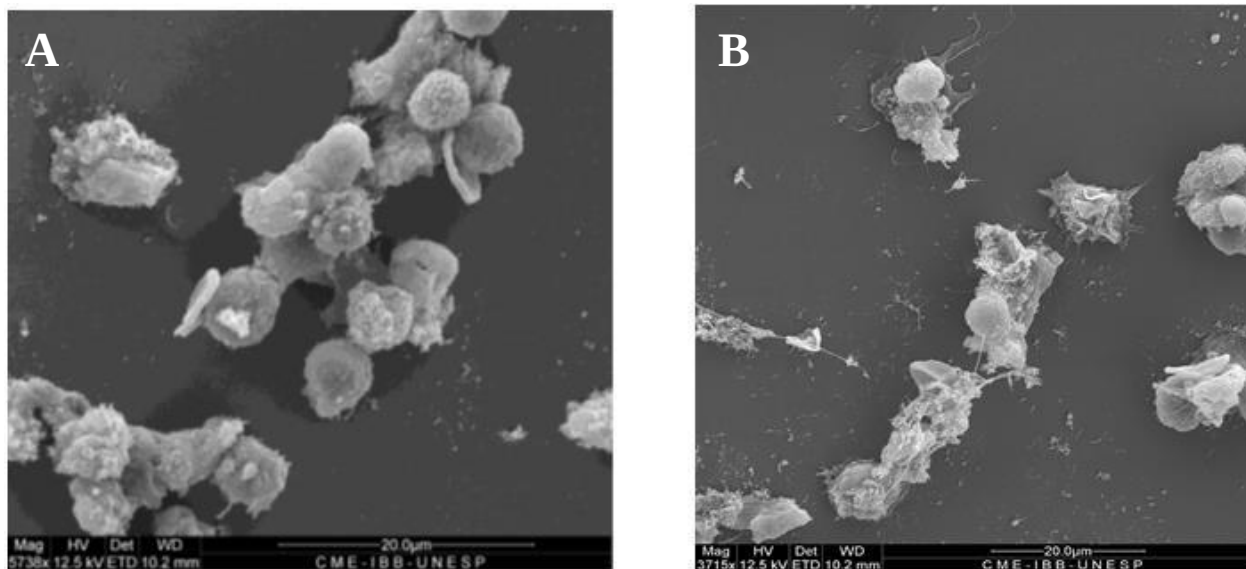


**Fig.3** Scanning microscopy of neutrophil cultures challenged with PMA, during two hours of incubation at 37 °C at 5% CO<sub>2</sub>, and treated with DNase. (A) 5700x zoom

- Figure 4

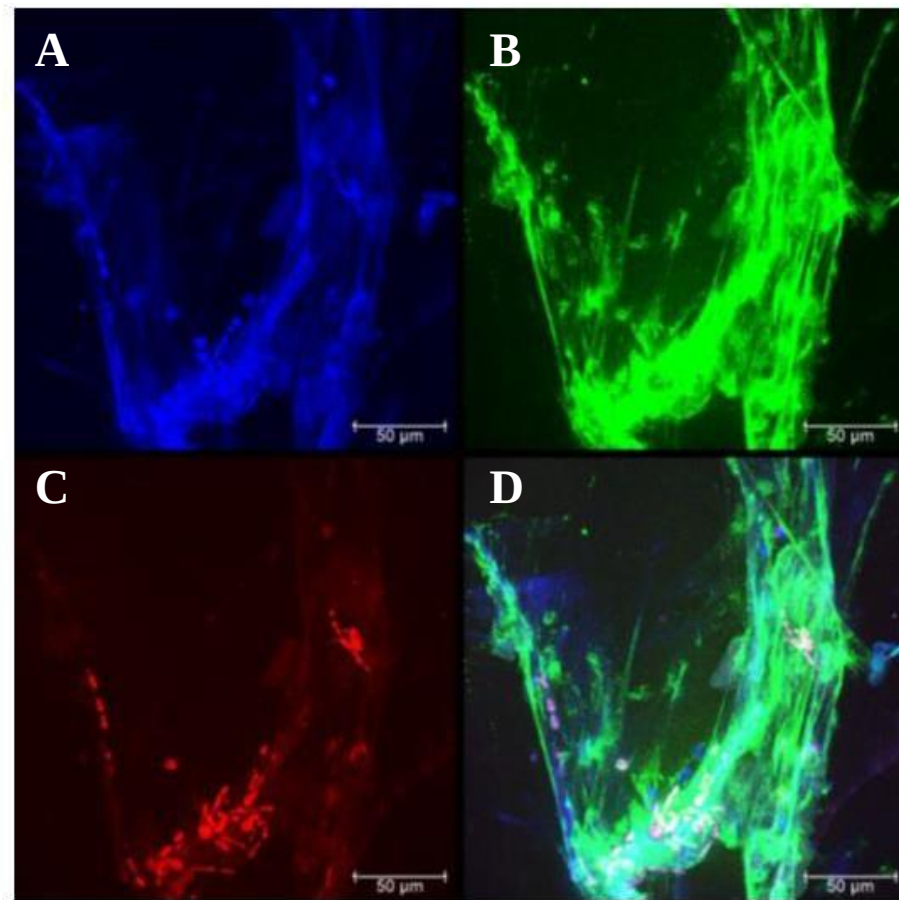


**Fig.4** Confocal microscopy of neutrophil cultures challenged with *P. brasiliensis* avirulent strain (Pb265), during two hours of incubation at 37 ° C at 5% CO<sub>2</sub>. (A) DNA; (B) Elastase; (C) Histones; (D) Overlapping images.

- Figure 5

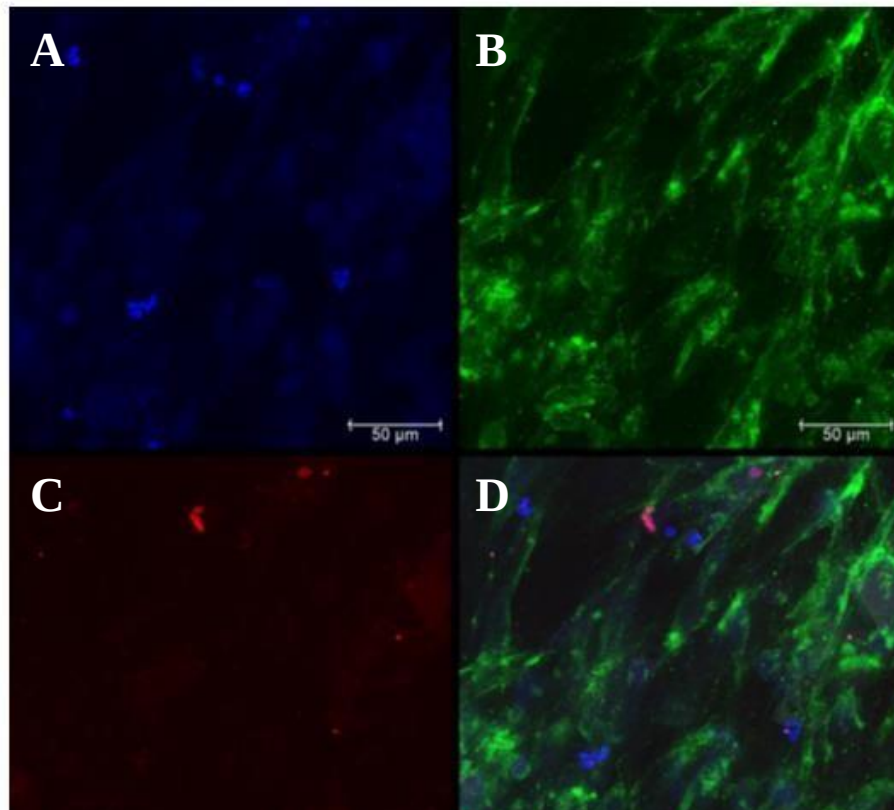


**Fig.5** Confocal microscopy of neutrophil cultures challenged with *P. brasiliensis* virulent strain (Pb18), during two hours of incubation at 37 ° C at 5% CO<sub>2</sub>. (A) DNA; (B) Elastase; (C) Histones; (D) Overlapping images.

- Figure 6

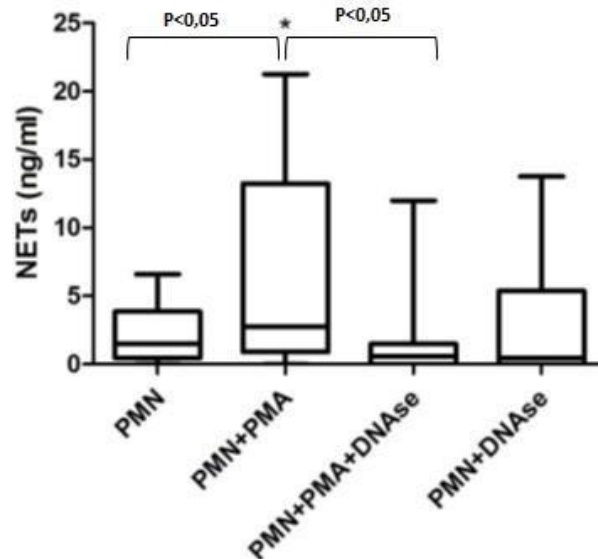


**Fig.6** Quantification of NETs in culture supernatants treated or not with PMA and/or DNase. Representative box plots from 10 individuals tested.

- Figure 7

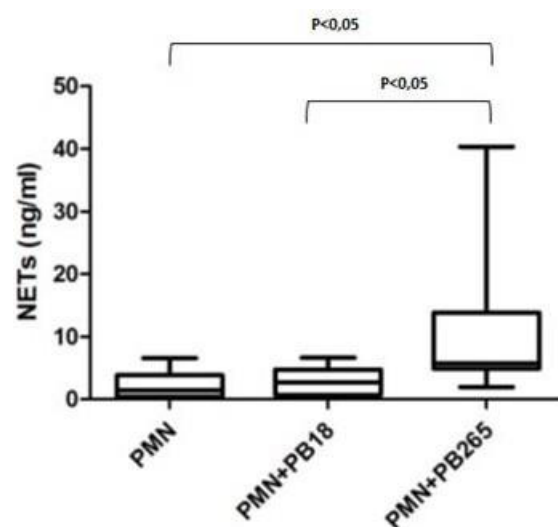


**Fig.7** Quantification of NETs in culture supernatants challenged or not with Pb18 or Pb265. Representative box plots from 10 individuals tested.

- Figure 8

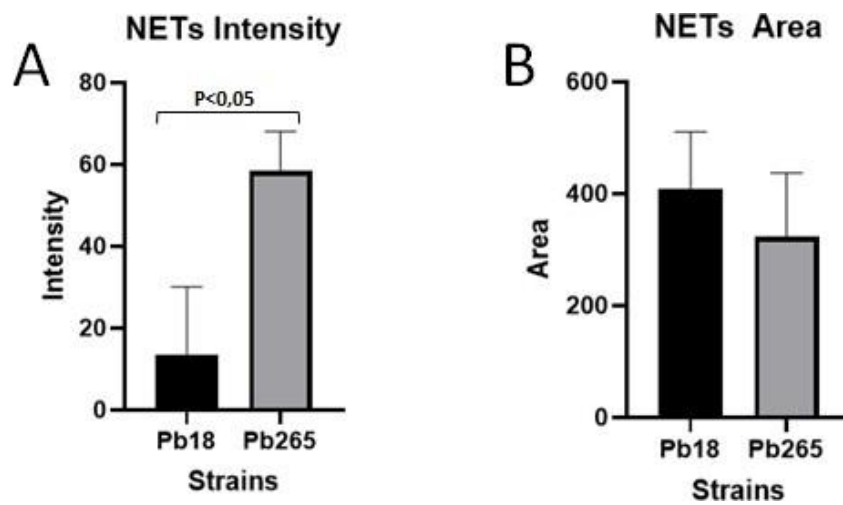


**Fig.8** Analysis of NETs intensity (A) and area (B) by IMARIS program. Representative from 8 individuals analysed.

- Figure 9

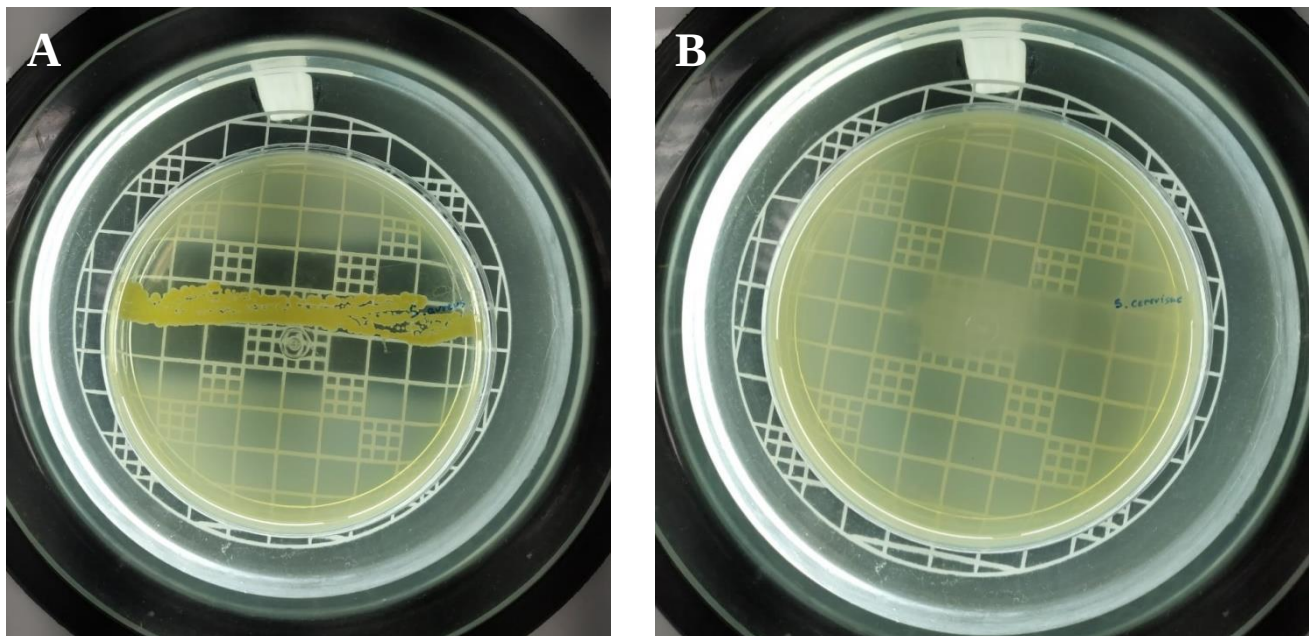


**Fig.9** *S. aureus* and *S. cerevisiae* grown on DNase test agar medium, demonstrating degradation of DNA from medium at A and no degradation at figure B.

- Figure 10

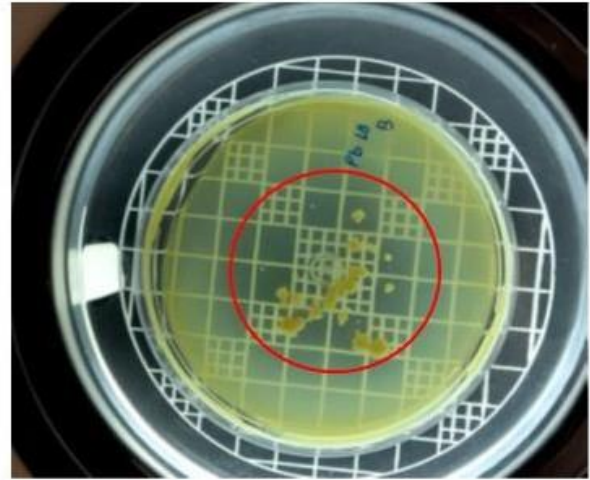
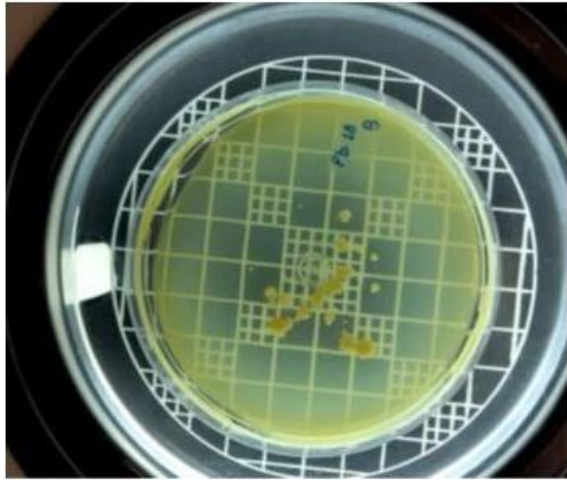


**Fig.10** Virulent strain (Pb18) grown on DNase test agar medium, demonstrating degradation of DNA from medium by fungus.

- Figure 11

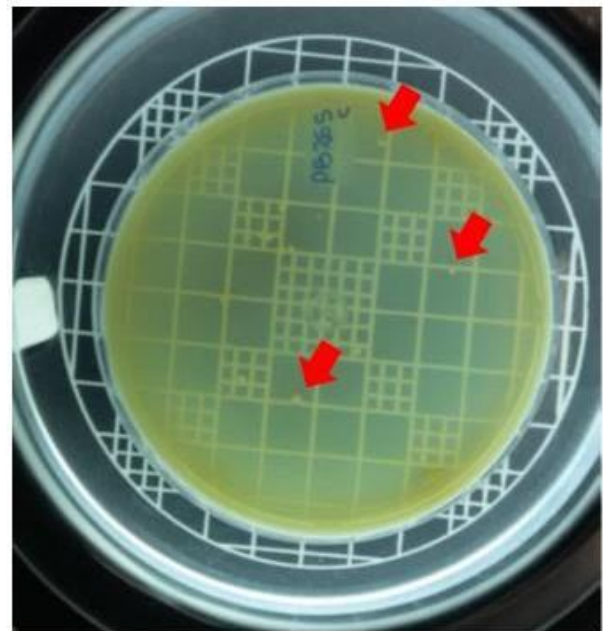
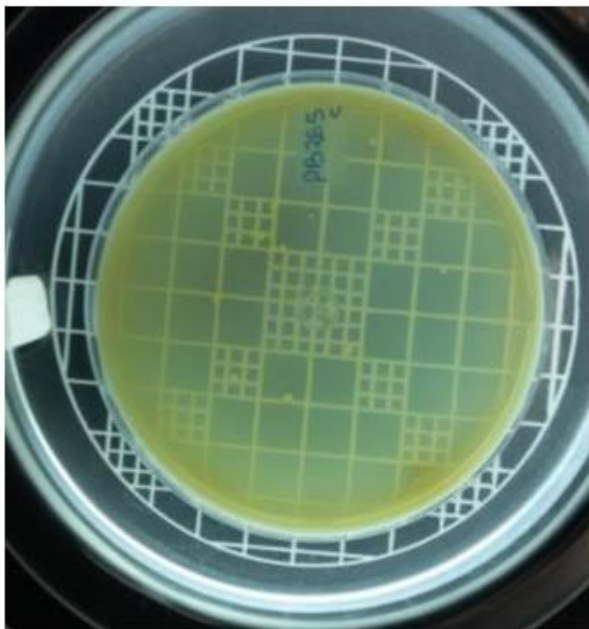


**Fig.11** Avirulent strain (Pb265) grown on DNase test agar medium, demonstrating the absence of degradation of DNA from medium by fungus.

- Figure 12

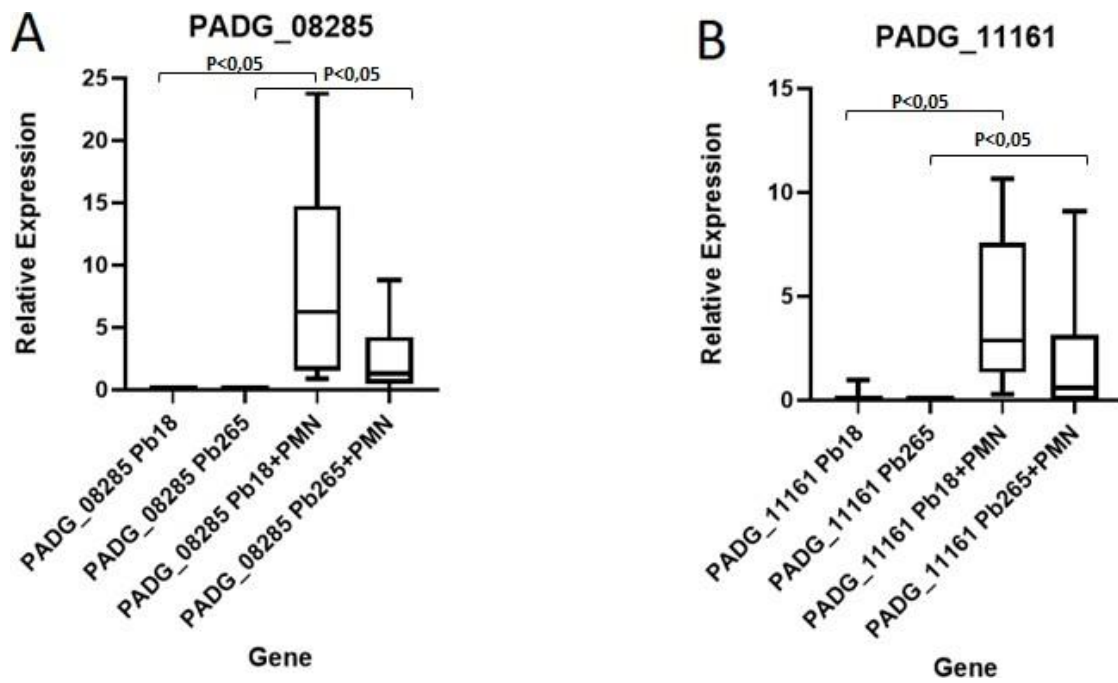


**Fig.12** Relative Gene Expression *versus* Gene and strain. (A) Gene PADG\_08285 and (B) Gene PADG\_11161. Representative Box Plot from 10 individuals tested.

*Anexo 1*

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada **"Ação de DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* sobre NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo"**, que pretende estudar o efeito da DNase sobre as NETs produzidas por neutrófilos humanos desafiados com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*)

A pesquisa consta da coleta de 40 mL de sangue de voluntários saudáveis, realizada uma única vez, e esse volume é necessário para se conseguir número suficiente de células de interesse para realização do projeto. Os riscos e o desconforto da coleta são mínimos e de total responsabilidade da pesquisadora. O indivíduo poderá sentir um leve incômodo durante a coleta e posteriormente pode ser que apareça um pequeno hematoma (mancha roxa) no local. A coleta de sangue é a mesma que se realiza em laboratório de análises clínicas, sendo muito segura. O sangue coletado será processado na UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) da Faculdade de Medicina de Botucatu e será utilizado em sua integralidade para realização das culturas celulares que serão utilizadas no desenvolvimento da pesquisa. O material colhido e seus derivados serão descartados após o término da pesquisa.

Esta pesquisa pretende identificar a produção de DNase pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* quando em contato com neutrófilos, que são células do sistema imunológico, e a ação dessa DNase quando em contato com as NETs (Neutrophil Extracellular Traps), sendo que esse estudo pode ajudar a entender os métodos de sobrevivência fúngica no organismo.

Caso o senhor (a) não queira participar da pesquisa, informo que não haverá nenhuma interferência em futuros procedimentos no âmbito da Faculdade de Medicina de Botucatu. O senhor (a) poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido o total sigilo de seus dados relatados nesta pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

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

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

**CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA**

Botucatu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 \_\_\_\_\_

Nome completo: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador: Yohan Ricci Zonta  
Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infecciosos  
Unipex - Bloco 5  
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP  
Telefone: (14) 3880-1750 / Celular: (14) 98152-7194  
E-mail: yohanzonta@hotmail.com

\_\_\_\_\_  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Alarcão Dias-Melicio  
Departamento de Patologia  
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP  
Telefone: (14) 3880-1592  
E-mail: ladiasmelicio@fmb.unesp.br

**Annex 1.1** Termo de consentimento Livre e Esclarecido entregue aos Doadores Voluntários de Sangue.

## **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Ação de DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* sobre NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo.

**Pesquisador:** YOHAN RICCI ZONTA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 85654018.9.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.577.243

#### **Apresentação do Projeto:**

A pesquisa de mestrado intitulada "Ação de DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* sobre NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo" que será realizada em parceria com a UNIPEX, tem grande relevância clínica e bom desenho metodológico. Serão coletados sangue de 20 sujeitos saudáveis e posterior análise laboratorial dos NETs.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral deste trabalho será identificar nas culturas de neutrófilos desafiadas com as cepas Pb18 e Pb265, a presença da DNase fúngica ou proteína com atividade semelhante à DNase, e correlacionar com os diferentes padrões de NETs induzidos pelas diferentes cepas. Especificamente avaliaremos:- As NETs induzidas pelas diferentes cepas em culturas de neutrófilos humanos avaliadas por Microscopia de Varredura e Microscopia Confocal para a visualização da conformação das NETs e de seus componentes em culturas in vitro, e técnica de High-Content para avaliação do tamanho (área) das redes formadas;- Quantificação de DNA extracelular e de NETs nas culturas de neutrófilos desafiadas com as duas diferentes cepas;- Quantificação relativa da expressão de mRNA para DNase like fúngica por RT-PCR em tempo real nas diferentes culturas.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O riscos são aqueles inerentes à coleta do sangue, como a possibilidade de formação de um

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.577.243

hematoma (mancha roxa) no local da coleta. Os benefícios são o de contribuir para o entendimento da resposta do hospedeiro frente à infecção fúngica.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é clara, relevante e exequível. Será executada com verba própria remanescente de outra pesquisa que possuía fomento.

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram postados como TCLE, Folha Rosto, EAP, Declaração Unipex, etc.

### Recomendações:

Não há.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto deve ser apreciado na reunião do colegiado deste comitê com vistas a aprovação e execução plena após.

### Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 02 de abril de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP. No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                             | Arquivo                                           | Postagem            | Autor             | Situação |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|-------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto             | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1085514.pdf     | 12/03/2018 15:23:19 |                   | Aceito   |
| Outros                                     | TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf                  | 12/03/2018 12:09:50 | YOHAN RICCI ZONTA | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                | declaracao_de_responsabilidade_do_pesquisador.pdf | 12/03/2018 12:09:05 | YOHAN RICCI ZONTA | Aceito   |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Aceite.Pdf                                        | 12/03/2018 12:07:27 | YOHAN RICCI ZONTA | Aceito   |

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.577.243

|                                                                    |                          |                        |                      |        |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------|
| Outros                                                             | Resolucao_466.pdf        | 12/03/2018<br>12:04:06 | YOHAN RICCI<br>ZONTA | Aceito |
| Projeto Detalhado /<br>Brochura<br>Investigador                    | Projeto.pdf              | 12/03/2018<br>11:59:02 | YOHAN RICCI<br>ZONTA | Aceito |
| TCLE / Termos de<br>Assentimento /<br>Justificativa de<br>Ausência | TCLE_Yohan_RZ.pdf        | 12/03/2018<br>09:26:29 | YOHAN RICCI<br>ZONTA | Aceito |
| Folha de Rosto                                                     | FolhaDeRostoAssinada.pdf | 12/03/2018<br>09:25:50 | YOHAN RICCI<br>ZONTA | Aceito |

### Situação do Parecer:

Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 03 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
**(Coordenador)**

**Annex 1.2** Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

*Anexo 2*

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



U.S. National Library of Medicine



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:qLNch02N5KnfEdsfujHpYaEc23CyA8Z1

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template

none

Specificity of primers

Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | ACGACCGTCTCTTCCTCTCA | 20     | 59.96 | 55.00 | 5.00                    | 1.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | CGTTCAAATCCTCGCTCGC  | 20     | 60.25 | 55.00 | 3.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[XM\\_024449845.1](#) PREDICTED: Homo sapiens fibronectin type III and SPRY domain containing 2 (FSD2), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 678
Forward primer  1      ACGACCGTCTCTTCCTCTCA    20
Template        130    .T....C..C.A.....    149

Reverse primer  1      CGTTCAAAATCCTCGCTCGC    20
Template        807    .A....T.C .....G..    788
```

>[XM\\_024449844.1](#) PREDICTED: Homo sapiens fibronectin type III and SPRY domain containing 2 (FSD2), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 795
Forward primer  1      ACGACCGTCTCTTCCTCTCA    20
Template        130    .T....C..C.A.....    149

Reverse primer  1      CGTTCAAAATCCTCGCTCGC    20
Template        924    .A....T.C .....G..    905
```

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## [NCBI](#)

[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.1** Prime BLAST PADG\_11161 (NW\_011371358.1) vs *Homo sapiens* (Genoma)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



U.S. National Library of Medicine



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:TVa5YU5r50\_c99j5udfqh6L62Jax5cWT

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template

none

Specificity of primers

No target templates were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database  
(Organism limited to Homo sapiens)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | TGAAGAACGCAGCGAAATGC | 20     | 60.11 | 50.00 | 5.00                    | 2.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | GGAATACCAGAGGGCGCAAT | 20     | 60.18 | 55.00 | 4.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

---

Products on allowed targets

---

Products on allowed transcript variants

---

Products on potentially unintended templates

---

Products on target templates

---

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## NCBI

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.2** Prime BLAST PADG\_11161 (NW\_011371358.1) vs *Homo sapiens* (mRNA)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



U.S. National Library of Medicine



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:GBLH9AzMAWQmWhtfFj8\_bWwkLl9BNzVCQA

Primer-BLAST Results

[\[?\]](#)

- 

Input PCR template

none

Specificity of primers

No target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)

[\[?\]](#)

### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | TGAAGAACGCAGCGAAATGC | 20     | 60.11 | 50.00 | 5.00                    | 2.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | GGAATACCAGAGGGCGCAAT | 20     | 60.18 | 55.00 | 4.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept

and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## NCBI

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike,  
Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.3** Prime BLAST PADG\_08285 (NW\_011371372.1) vs *Homo sapiens* (Genoma)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



[U.S. National Library of Medicine](#)



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:KDPbjsSEbaBWGFIWMzhgaCgVUnk7Ck98

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template  
none

Specificity of primers

Target templates were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | TTCTTCAGGAGCTGCTACGC | 20     | 60.11 | 55.00 | 6.00                    | 2.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | TATCCGGCAGCAGTAAGACG | 20     | 59.62 | 55.00 | 4.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[NW\\_011371358.1](#) Paracoccidioides brasiliensis Pb18 unplaced genomic scaffold supercont2.1, whole genome shotgun sequence

```
product length = 140
Forward primer  1          TTCTTCAGGAGCTGCTACGC  20
Template        2846822  .....  2846841

Reverse primer  1          TATCCGGCAGCAGTAAGACG  20
Template        2846961  .....  2846942
```

>[NW\\_011371360.1](#) Paracoccidioides brasiliensis Pb18 unplaced genomic scaffold supercont2.3, whole genome shotgun sequence

```
product length = 3468
Forward primer  1          TTCTTCAGGAGCTGCTACGC  20
Template        3341491  ..TA.A.T.....C...  3341510

Forward primer  1          TTCTTCAGGAGCTGCTACGC  20
Template        3344958  C....G.....C.A....  3344939
```

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## [NCBI](#)

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.4** Prime BLAST PADG\_08285 (NW\_011371372.1) vs *Homo sapiens* (mRNA)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



[U.S. National Library of Medicine](#)



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:IDvTBdYPfyTABkQIJSZ2dj4LRGctFFli

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template

none

Specificity of primers

Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Paracoccidioides brasiliensis, Paracoccidioides brasiliensis Pb18)

Other reports

[Search Summary](#)

## Detailed primer reports

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | TTCTTCAGGAGCTGCTACGC | 20     | 60.11 | 55.00 | 6.00                    | 2.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | TATCCGGCAGCAGTAAGACG | 20     | 59.62 | 55.00 | 4.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[XM\\_010758455.1](#) Paracoccidioides brasiliensis Pb18 hypothetical protein partial mRNA

```
product length = 140
Forward primer  1      TTCTTCAGGAGCTGCTACGC  20
Template        315    .....  334

Reverse primer  1      TATCCGGCAGCAGTAAGACG  20
Template        454    .....  435
```

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## NCBI

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike,  
Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.5** Prime BLAST rRNA vs *Homo sapiens* (Genoma)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



U.S. National Library of Medicine



NCBI National Center for Biotechnology Information

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:KSP2x6xdofWGy7vOtq6f\_My1js7hppXT4A

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template  
none

Specificity of primers

No target templates were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')       | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|-------------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | TGCAGTTGAGATCCAATTACCCT | 23     | 59.73 | 43.48 | 6.00                    | 0.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | TGAACAAGGCCTCCCTTTGG    | 20     | 60.18 | 55.00 | 6.00                    | 1.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and

try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#) [YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## NCBI

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

### **Anexo 2.6** Prime BLAST rRNA vs *Homo sapiens* (mRNA)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



U.S. National Library of Medicine



NCBI National Center for Biotechnology Information

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:EwjgtcS\_bZtWl1ItMwNgUyguUkI7MU9H

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template  
none

Specificity of primers

No target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Paracoccidioides brasiliensis, Paracoccidioides brasiliensis Pb18)

Other reports

[Search Summary](#)

## Detailed primer reports

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')       | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|-------------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | TGCAGTTGAGATCCAATTACCCT | 23     | 59.73 | 43.48 | 6.00                    | 0.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | TGAACAAGGCCTCCCTTTGG    | 20     | 60.18 | 55.00 | 6.00                    | 1.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and

try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#) [YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## NCBI

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.7** Prime BLAST PAAG\_07101 (XM\_002790819.1) vs *Homo sapiens* (Genoma)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



U.S. National Library of Medicine



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:2cIskriYEbwukSqfS7EY4VCcKvBDgzf1

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template  
none

Specificity of primers

Target templates were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | CCGGCAACAGCATTAGCATC | 20     | 59.97 | 55.00 | 4.00                    | 0.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | TGATCCGCTCTGATCTTCGC | 20     | 59.97 | 55.00 | 6.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

---

Products on allowed targets

---

Products on allowed transcript variants

---

Products on potentially unintended templates

---

Products on target templates

>[NC\\_000006.12](#) Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 2233

Features flanking this product:

[55956 bp at 5' side: 5-hydroxytryptamine receptor 1B](#)

[169081 bp at 3' side: meiosis-specific protein MEI4](#)

|                |          |                      |          |
|----------------|----------|----------------------|----------|
| Forward primer | 1        | CCGGCAACAGCATTAGCATC | 20       |
| Template       | 77519358 | TTT..T.....G.....    | 77519377 |

|                |          |                      |          |
|----------------|----------|----------------------|----------|
| Reverse primer | 1        | TGATCCGCTCTGATCTTCGC | 20       |
| Template       | 77521590 | A.T..T .....T        | 77521571 |

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

## [NCBI](#)

[National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2.8** Prime BLAST PAAG\_07101 (XM\_002790819.1) vs *Homo sapiens* (mRNA)

- [NCBI Home](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Skip to Main Content](#)
- [Skip to Navigation](#)
- [About NCBI Accesskeys](#)



[U.S. National Library of Medicine](#)



[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

- 
- [My NCBI](#)
- [Sign in to NCBI](#)
- [Register](#)
- [Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:NS7Afrh0EVAufSpzS10YDVBwKhxDbzcZ

Primer-BLAST Results



- 

Input PCR template  
none

Specificity of primers

Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports

[Search Summary](#)

## [Detailed primer reports](#)

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers [Submit](#)



### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | CCGGCAACAGCATTAGCATC | 20     | 59.97 | 55.00 | 4.00                    | 0.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | TGATCCGCTCTGATCTTCGC | 20     | 59.97 | 55.00 | 6.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[XM\\_006724713.3](#) PREDICTED: Homo sapiens insulin receptor substrate 4 (IRS4), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 2494
Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        1262  G.A..T.....C.....  1281

Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        3755  G.AT..G .....A.  3736
```

>[XM\\_005262220.2](#) PREDICTED: Homo sapiens insulin receptor substrate 4 (IRS4), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 2494
Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        1262  G.A..T.....C.....  1281

Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        3755  G.AT..G .....A.  3736
```

>[XM\\_011531061.1](#) PREDICTED: Homo sapiens insulin receptor substrate 4 (IRS4), transcript variant X1, mRNA

```
product length = 2494
Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        1262  G.A..T.....C.....  1281

Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        3755  G.AT..G .....A.  3736
```

>[NM\\_003604.2](#) Homo sapiens insulin receptor substrate 4 (IRS4), mRNA

```
product length = 2494
Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        1055  G.A..T.....C.....  1074

Forward primer  1      CCGGCAACAGCATTAGCATC  20
Template        3548  G.AT..G .....A.  3529
```

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers



BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine

[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)

[National Library Of Medicine](#)

[National Institutes Of Health](#)

[U.S. Department of Health & Human Services](#)

[USA.gov](#)

**NCBI**

*National Center for Biotechnology Information, [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike,  
Bethesda MD, 20894 USA*

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

[NCBI Home](#)  
[Sign in to NCBI](#)  
[Skip to Main Content](#)  
[Skip to Navigation](#)  
[About NCBI Accesskeys](#)

[U.S. National Library of Medicine](#)

[NCBI National Center for Biotechnology Information](#)

[My NCBI](#)  
[Sign in to NCBI](#)  
[Register](#)  
[Sign Out](#)

[Primer-BLAST](#)» JOB ID:zdY54k3o5MzfdNt6ulTpBKF52xWyZsYQ

Primer-BLAST Results

[\[?\]](#)

Input PCR template

none

Specificity of primers

Target templates were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports

[Search Summary](#)

## Detailed primer reports

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers

[\[?\]](#)

### Primer pair 1

|                           | Sequence (5'->3')    | Length | Tm    | GC%   | Self<br>complementarity | Self 3'<br>complementarity |
|---------------------------|----------------------|--------|-------|-------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Forward<br/>primer</b> | ACGACCGTCTCTTCCTCTCA | 20     | 59.96 | 55.00 | 5.00                    | 1.00                       |
| <b>Reverse<br/>primer</b> | CGTTCAAATCCTCGCTCGC  | 20     | 60.25 | 55.00 | 3.00                    | 2.00                       |

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[NC\\_000012.12](#) Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 1553

Features flanking this product:

[192236 bp at 5' side: nuclear receptor corepressor 2 isoform 2](#)  
[89428 bp at 3' side: scavenger receptor class B member 1 isoform 9](#)

|                |           |                      |           |
|----------------|-----------|----------------------|-----------|
| Forward primer | 1         | ACGACCGTCTCTTCCTCTCA | 20        |
| Template       | 124687486 | T.TC.T .....T        | 124687505 |

|                |           |                      |           |
|----------------|-----------|----------------------|-----------|
| Forward primer | 1         | ACGACCGTCTCTTCCTCTCA | 20        |
| Template       | 124689038 | TTTC.A.....          | 124689019 |

If you want to allow any of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers

[\[?\]](#)

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine

[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)

[National Library Of Medicine](#)

[National Institutes Of Health](#)

[U.S. Department of Health & Human Services](#)

[USA.gov](#)

**[NCBI](#)**

*[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA*

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**Anexo 2, Fig 1.** Gel de agarose demonstrando que os produtos amplificados possuem o número esperado de bases, conforme indicado pelas bandas únicas. (A) PAAG\_07101: 140pb; (B) PAAG\_12429: 111pb; (C) PADG\_11161: 146pb; (D) PADG\_08285: 127pb; (E) rRNA: 93pb; (L) Ladder, escalando de 100 em 100pb.