

Helanderson de Almeida Balderramas

**Receptores envolvidos na produção de citocinas e
eicosanóides por monócitos e neutrófilos
humanos em resposta ao *Paracoccidioides
brasilensis***

Orientadora: Prof^a Titular Ângela M. V. de Campos Soares

Co-orientador: Prof Assistente Dr Silvio Luis de Oliveira

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais.

Botucatu – SP

2013

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista campus Botucatu e no Laboratório de Citometria de fluxo da Fundação Amaral Carvalho, Jaú-SP

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais Hélio e Roselene, e ao meu irmão Helerson, aqueles que ao longo de toda a vida tem dispensado a mim o incentivo, a confiança, o amparo, o exemplo de vida e sobretudo: o amor.

A minha amada namorada Verusca, pela confiança, paciência, incentivo e principalmente por me coroar a cada dia com o mais nobre dos sentimentos...

Preste atenção nos sinais e não deixe que as loucuras do dia-a-dia o deixem cego para a melhor coisa da vida: O amor...

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Ao término desta tese de doutorado resta-me deixar registrando os meus sinceros e infintos agradecimentos a todos que de várias formas contribuíram para que se tornasse uma realidade.

À Deus, que me supre, me capacita e me respalda!

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Ângela M. V. C. Soares, pela ótima orientação, incentivo e confiança. Acolheu-me de forma absoluta em um momento difícil e sempre me tratou com muito esmero, com traços maternos, o que lhe é característico. Sempre serei grato!

Ao meu Coorientador Dr Silvio Luis de Oliveira, responsável por meu ingresso na ciência, e pela orientação não só científica, mas humana, social e de certa forma paternal. Foram longos e prazerosos anos ao seu lado, que jamais sairão da memória! Gratidão eterna. Antes de Orientador e Coorientador: amigo incondicional!

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Amaral Carvalho-Jaú-SP que na pessoa de Dr^a Maura R. V. Ikoma e Marcimara Penitetti possibilitaram a execução de todas as análises relacionadas à citometria de fluxo. Obrigado pelo profissionalismo, parceria e dedicação.

Aos meus colegas pós-graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Guilherme, Bruno Trindade, Daniela, Tatiana, Régis, Ana Paula, Thales, Vinícius, Camila, Keila, Michelle, Ingrid, Mariana, Sofia,

Fernanda, Marcela, Juliana e Thaila. Obrigado pela ajuda e pelos bons e agradáveis momentos de convívio.

Aos Docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Ramon Kaneno, Maurício Sforcin, Alexandrina Sartori, Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Eduardo Bagagli e Ary Fernandes Júnior por contribuírem de forma fundamental em minha formação e na realização desse trabalho.

Aos membros de minha banca de qualificação Prof Dr Ramon Kaneno e Prof^a Dr^a Luciane A. Dias-Melicio pela contribuição e sugestões para a melhoria do trabalho.

As secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Sônia Faraldo, Leonice Garcia, e Ana que nunca mediram esforços para me ajudar.

A secretária do Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Solange Sako Cagliari pela disponibilidade em me ajudar sempre.

Ao Prof Dr Paulo Câmara Marques Pereira, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, sempre apoiando.

Ao Luis Severino dos Santos (Lula) e Luis Henrique Alquati, pelo auxílio técnico e pelos momentos de descontração.

Aos amigos moradores e frequentadores da república Kissassa: João Paulo, Neto, Márcio, Podé, Eudriano, Gigi, Bife, Tcheca, Felipão, Paulinho, Boi, Fábio Seiva, Khaled, Pedrão, Jorginho, Napa, Xuxa, Japa, Gilmar, Vidal, Castilho, Aline, Erica e Grazi, sem vocês nada disso teria acontecido de forma tão agradável e divertida... E por que não também, aos “nossos” dois cães, Bob e Mel que ao longo desses anos só nos trouxeram alegria e aquele companheirismo peculiar dos canídeos.

Aos meus queridos sogros, João Bosco e Hermínia, e minha cunhada Lívia, por terem praticamente me adotado como filho e terem dado todo o suporte possível e necessário nesses anos em Botucatu. Seguramente, minha segunda Família.

Aos queridos amigos de Bauru Daniel, Giu, Josias, Cristiano, Silvio, Márcio, Thiago, Andrei e Osmar sempre apoiando e incentivando minha caminhada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro prestado.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

1. RESUMO	15
2. ABSTRACT	17
3. INTRODUÇÃO	19
4. OBJETIVO	32
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
5.1 <i>Casuística</i>	35
5.2 <i>Culturas de monócitos e neutrófilos do sangue periférico</i>	35
5.3 <i>Culturas de P. brasiliensis</i>	36
5.4 <i>Obtenção da suspensão de P. brasiliensis inativados</i>	36
5.5 <i>Cinética da expressão de receptores constitutivos de monócitos e neutrófilos</i>	37
5.6 <i>Avaliação da efetividade dos bloqueios dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 por citometria de fluxo</i>	37
5.7 <i>Bloqueio dos receptores e tratamento com os estímulos</i>	38
5.8 <i>Avaliação da produção de citocinas e de PGE₂ e LTB₄</i>	39
5.9 <i>Avaliação da expressão de IL-10 intracitoplasmática em neutrófilos por citometria de fluxo</i>	39
5.10 <i>Análise estatística</i>	40
6. RESULTADOS	41
6.1 <i>Avaliação da expressão constitutiva de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 em monócitos e neutrófilos</i>	42
6.2 <i>Avaliação das concentrações ideais de anticorpos anti-TLR2, anti-MR, anti-dectina-1 e anti-TLR4 para a determinação do</i>	

<i>bloqueio dos respectivos receptores em monócitos e neutrófilos.....</i>	<i>45</i>
6.3 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de TNF-α por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>54</i>
6.4 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de IL-12 por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>56</i>
6.5 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de IL-10 por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>58</i>
6.6 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de PGE₂ por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>60</i>
6.7 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de LTB₄ por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>62</i>
6.8 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de citocinas por neutrófilos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>64</i>
6.9 <i>Avaliação da expressão de IL-10 intracitoplasmática em neutrófilos por citometria de fluxo.....</i>	<i>68</i>
6.10 <i>Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de PGE₂, por neutrófilos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>70</i>
6.11 <i>Efeito de TLR2, MR e dectina-1 sobre a produção de LTB₄ por neutrófilos desafiados com Pb18 ou Pb265.....</i>	<i>72</i>
7. DISCUSSÃO.....	74
8. CONCLUSÃO.....	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
10. ANEXOS.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HPETE	5-hidroperoxieicosatetraenóico
5-LO	5-lipoxigenase
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AA	Ácido Araquidônico
Anti-Dectina-1	Anticorpo monoclonal anti-Dectina-1 humano
Anti-MR	Anticorpo monoclonal anti-CD-206 humano
Anti-TLR2	Anticorpo monoclonal anti-CD-282 humano
Anti-TLR4	Anticorpo monoclonal anti-284 humano
APC	Célula apresentadora de antígeno
APC*	Aloficocianina
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
T CD₄⁺	Linfócito TCD4 ⁺
T CD₈⁺	Linfócito TCD4 ⁺
T CD₄⁺ CD₂₅⁺	Linfócito T regulador
cPLA₂	Fosfolipase A ₂
CR3	Receptor de complemento 3
DC	Células dendríticas
DC-Sign	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
Dec	Dectina-1
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
FA	Forma adulta ou crônica
FJ	Forma juvenil ou aguda
FcγR	Fragmento cristalizável da Imunoglobulina G
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Limiar de dispersão frontal
gp43	Glicoproteína de 43.000 daltons
GPCR	Receptores acoplados a proteína G

GPY	Glicose, peptona e extrato de levedura
GXM	Glicuronoxilomanana
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KC	Quimiocina da subfamília CXC
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA₄	Leucotrieno A ₄
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTC₄	Leucotrieno C ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
LTE₄	Leucotrieno E ₄
LTs	Leucotrienos
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCCC	Meio de Cultura de Células Completo
MIP-2	Quimiocina da subfamília CXC
MR	Receptor de manose
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Célula exterminadora natural
NO	Óxido nítrico
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

PAMPS	Padrão molecular associado a patógenos
Pb 18	Cepa de alta virulência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb 265	Cepa de baixa virulência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PE	Ficoeritrina
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PGH	Prostaglandina H
PGs	Prostaglandinas
PI	Paracoccidioidomicose-infecção
PLs	Fosfolipases
PMN	Polimorfonucleares
PNG	Peptídeoglicano
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROIS	Reativos intermediários do oxigênio
RPMI	Meio de cultura celular
SSC	Limiar de dispersão lateral
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
TLR1	<i>Toll-like receptor 1</i>
TLR₂	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR2^{-/-}	Animais nocauteados para <i>Toll-like receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLR6	<i>Toll-like receptor 6</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias

LISTA DE FIGURAS

1	Expressão constitutiva de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 em monócitos.....	44
2	Expressão constitutiva de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 em neutrófilos.....	44
3	Bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal em monócitos.....	46
4	Bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal em neutrófilos.....	47
5	Bloqueio de MR com anticorpo monoclonal em monócitos.....	48
6	Bloqueio de MR com anticorpo monoclonal em neutrófilos.....	49
7	Bloqueio de Dectina-1 com anticorpo monoclonal em monócitos.....	50
8	Bloqueio de Dectina-1 com anticorpo monoclonal em neutrófilos.....	51
9	Bloqueio de TLR4 com anticorpo monoclonal em monócitos.....	52
10	Bloqueio de TLR4 com anticorpo monoclonal em neutrófilos.....	53
11	Efeito dos receptores sobre a produção de TNF- α por monócitos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	55
12	Efeito dos receptores sobre a produção de TNF- α por monócitos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	55
13	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-12 por monócitos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	57
14	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-12 por monócitos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	57
15	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-10 por monócitos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	59

16	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-10 por monócitos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	59
17	Efeito de dos receptores sobre a produção de PGE ₂ por monócitos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	61
18	Efeito de dos receptores sobre a produção de PGE ₂ por monócitos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	61
19	Efeito de dos receptores sobre a produção de LTB ₄ por monócitos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	63
20	Efeito de dos receptores sobre a produção de LTB ₄ por monócitos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	63
21	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-12 por neutrófilos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	65
22	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-12 por neutrófilos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	65
23	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-10 por neutrófilos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	67
24	Efeito de dos receptores sobre a produção de IL-10 por neutrófilos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	67
25	Efeito de dos receptores sobre a expressão de IL-10 intracitoplasmática por neutrófilos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.....	69
26	Efeito de dos receptores sobre a produção de PGE ₂ por neutrófilos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	71
27	Efeito de dos receptores sobre a produção de PGE ₂ por neutrófilos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	71

28	Efeito de dos receptores sobre a produção de LTB ₄ por neutrófilos desafiados por 4h com <i>P. brasiliensis</i>	73
29	Efeito de dos receptores sobre a produção de LTB ₄ por neutrófilos desafiados por 18h com <i>P. brasiliensis</i>	73

1- RESUMO

BALDERRAMAS, H. A. **Receptores envolvidos na produção de citocinas e eicosanóides por monócitos e neutrófilos humanos em resposta ao *Paracoccidioides brasiliensis***. 2013. 104f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. Dentre os vários mecanismos da resposta inata contra esse fungo, os envolvendo as células fagocitárias desempenham papel central na contenção do processo infeccioso, com destaque para a participação na atividade fungicida e modulação da resposta inflamatória. As funções das células fagocitárias contra os diversos microrganismos, incluindo os fungos, são iniciadas a partir de mecanismos de ativação dessas células, gerados após o reconhecimento dos mesmos por receptores de reconhecimento de estruturas moleculares padrões (PRRs) que reconhecem estruturas moleculares compartilhadas por determinados grupos de microrganismos, os chamados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Nosso estudo objetivou estudar a participação dos receptores TLR2, TLR4, receptor de manose (MR) e dectina-1, na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e dos eicosanóides PGE₂ e LTB₄, por monócitos e neutrófilos humanos em resposta a cepas de *P. brasiliensis* de alta (Pb18) e baixa virulência (Pb265). Verificamos que as duas cepas do fungo, mas principalmente a Pb265 são capazes de induzir a produção de TNF- α por monócitos. TLR2 e TLR4 foram os receptores que se mostraram mais envolvidos nesse processo. Adicionalmente, mostramos a capacidade de essas células liberarem IL-12 em resposta ao fungo, sendo os maiores níveis detectados para a cepa Pb265 e ocorrendo um importante papel do TLR4 e MR. Altos níveis de IL-10 também foram detectados, principalmente em resposta à cepa Pb18 para a qual houve um envolvimento do TLR2 e do MR. Para a cepa 265, o receptor de maior envolvimento foi o TLR2. As duas cepas, de forma semelhante, foram capazes de induzir uma maior produção de PGE₂ e LTB₄ pelos monócitos. No entanto, nenhum dos PRRs mostrou-se envolvido na produção dos mediadores. Os neutrófilos não produziram TNF- α em resposta ao fungo. Ao contrário,

detectamos concentrações significativas de IL-12, particularmente em resposta a Pb265 com uma importante participação do TLR2, dectina-1 e TLR4. Os neutrófilos ainda produziram IL-10 principalmente em relação à cepa mais virulenta e os receptores envolvidos na produção foram o MR e o TLR2 enquanto que na cepa 265 o receptor envolvido foi o TLR2. Essas células ainda produziram PGE₂ e LTB₄ de forma semelhante, em resposta às duas cepas. Adicionalmente, embora não tenhamos evidenciado a participação de nenhum dos receptores na produção de LTB₄, no caso da PGE₂ ocorreu um claro envolvimento de MR e dectina-1. Em função dos estudos citados acima, podemos discutir que a ligação do fungo a um mesmo PRR durante a resposta imune inata, pode resultar na produção de citocinas tanto pró como anti-inflamatórias e conseqüentemente em ativação ou desativação das células fagocitárias, para que elas exerçam suas atividades antifúngicas. Da mesma forma, essas células poderão exercer uma modulação positiva ou negativa sobre a resposta imune adaptativa subsequente. Acreditamos que na dependência da cepa que está entrando em contato com esse receptor, envolvendo concentrações diferentes de PAMPS, pode ocorrer a produção de um ou outro tipo de citocina e conseqüentemente, em modulação positiva ou negativa da resposta imune inata e adaptativa.

Palavras-chave: Citocinas; Eicosanóides; *Paracoccidioides brasiliensis*; Receptores celulares.

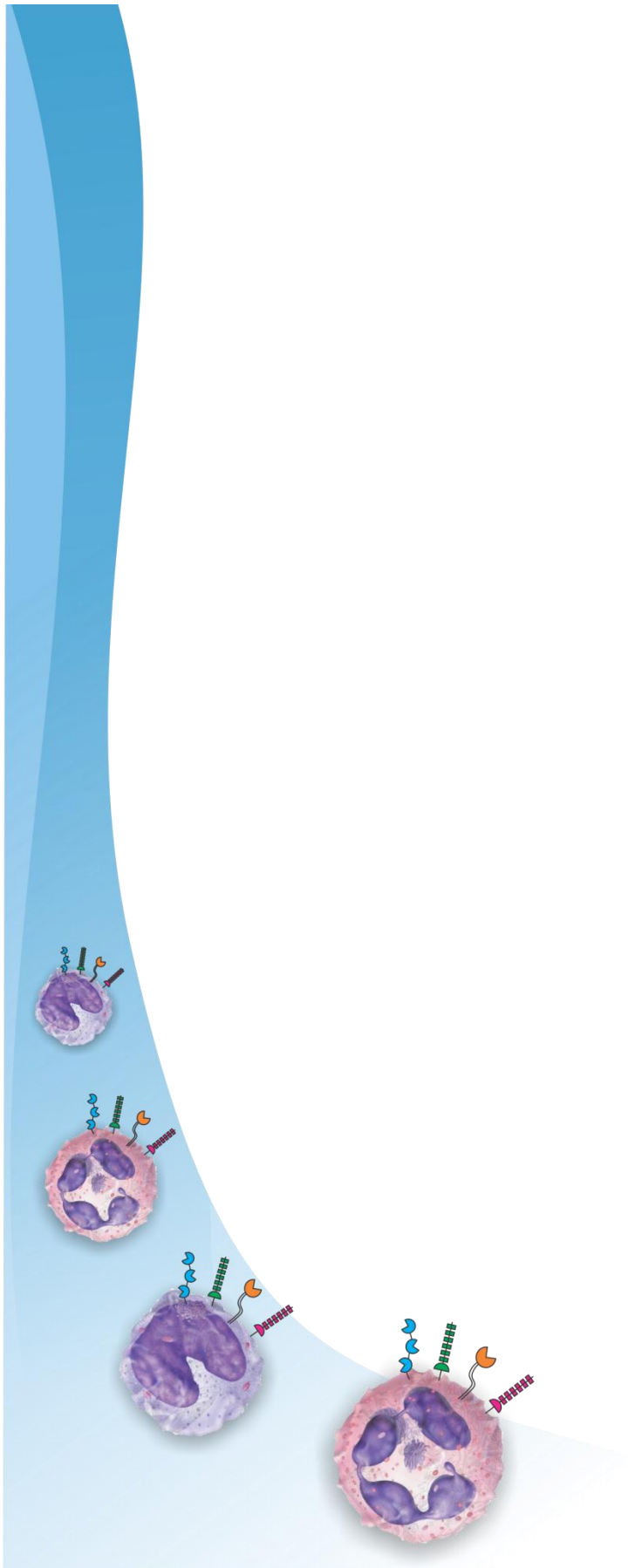
2. ABSTRACT

BALDERRAMAS, H. A. **Receptors involved in the release of cytokines and eicosanoids by human neutrophils and monocytes in response to *Paracoccidioides brasiliensis***. 2013. 104f. Thesis (Ph.D.) - Botucatu School of Medicine, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Paracoccidioides brasiliensis is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, the most prevalent deep mycosis in Latin America. During the innate immune response of the host against this fungus, phagocytic cells play an essential role, highlighting their participation in fungicidal activity and modulation of the inflammatory response. The functions of phagocytic cells against various microorganisms, including fungi, are initiated by the recognition of patterns molecular structures, shared by a group of microorganisms, called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), by pattern recognizing receptors (PRRs) expressed by these cells. In this study, we assessed the involvement of the PRRs : TLR2, TLR4, mannose receptor (MR) and dectin-1, in the production of pró and anti-inflammatory cytokines and the eicosanoid PGE₂ and LTB₄, by human monocytes and neutrophils in response to high- (Pb18) and a low- (Pb265) virulence strain of *P. brasiliensis*. We showed that monocytes produce TNF-alpha and IL-12 in response to both strains, but with higher levels to Pb 265. TLR2 and TLR4 were the main receptors involved in TNF-alpha production, while for IL-12, the participation of TLR4 and MR was detected. High levels of IL-10 were also observed, mainly in response to Pb18, with involvement of TLR2 and MR. For Pb265, the receptor responsible was TLR2. Boths strains were able to induce PGE₂ and LTB₄ by monocytes. However, none of the studied receptors was shown to be involved in this production. Neutrophils did not produce TNF-alpha in response to both strains. On the other hand, these cells produce IL-12, mainly in response to Pb265, with participation of TLR2, dectin-1 and TLR4. These cells also produce L-10, whose levels were higher for Pb18 with involvement of TLR2 and MR and only TLR2 for Pb265. The production of PGE₂ and LTB₄ was also detected for these cells, similarly for the two strains. For PGE₂, it was clear that MR and dectin-1 were involved, while in relation to LTB₄, none of the receptors seems to participate. In light of our findings, we can discuss that

fungus binding to a particular PRR during the innate immune response, can result in the production of both, pró and anti- inflammatory cytokines and consequently in activation or deactivation of the phagocytic cells, with respect to their antifungal activities. Likewise, these cells may exert positive or negative modulation on the subsequent adaptive immune response. We are considering that, depending on the strain that comes in contact with the receptor, involving different concentrations of PAMPs, either or other type of cytokine will be produced, resulting in positive or negative modulation of innate and adaptive immune response.

Keywords: Cytokines; Eicosanoids; *Paracoccidioides brasiliensis*; Cellular receptors.



Introdução

1. Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo imperfeito e dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* e quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos, e na forma de micélio à temperatura ambiente com variação de 4 a 28°C (Restrepo & Tobón, 2005).

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos provavelmente presentes no solo, na água e nas plantas que penetram no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando um complexo primário pulmonar. Esse processo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção (PI), identificada pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, mas desenvolvimento de uma resposta imune específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (Oliveira, 2002). Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com consequente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais, pela via linfo-hematogênica (Franco *et al.*, 1987). As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas aguda (FJ) e crônica (FA) da doença. A FJ é habitualmente grave, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A FA tem duração prolongada, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema (Franco *et al.*, 1993; Mendes, 1994).

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

Dentre os vários mecanismos da resposta inata contra fungos, os envolvendo as células fagocitárias desempenham papel central, com destaque para a participação na atividade fungicida e modulação da resposta inflamatória. Estas funções são iniciadas a partir de mecanismos de ativação dessas células, gerados após o reconhecimento desses microrganismos. Esse processo envolve um conjunto de receptores chamados de receptores de reconhecimento de estruturas moleculares padrões (PRRs) que reconhecem estruturas moleculares compartilhadas por um grande número de microrganismos, também conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Componentes estruturais altamente conservados presentes na parede das células fúngicas como β -glucanas, quitina e mananas são críticos para o crescimento e a sobrevivência dos fungos e constituem PAMPs ideais, reconhecidos por PRRS expressos em fagócitos e células dendríticas (DC). Estes incluem principalmente os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores de lectinas do tipo C. Considera-se que na dependência do PRR que serve como ligante para as várias estruturas fúngicas, vias sinalizadoras distintas podem ser desencadeadas influenciando sobremaneira a resposta do hospedeiro infectado, que pode ser de padrão tanto pró como antiinflamatório (Romani *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado um importante envolvimento dos TLRs no reconhecimento de fungos como *Cândida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans* e *P. brasiliensis* (Shoham *et al.*, 2001; Netea *et al.*, 2002; Bellocchio *et al.*, 2004; Yauch *et al.*, 2004; Viriyakosol *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006; Calich *et al.*, 2008). Os primeiros trabalhos foram realizados com *C. albicans* e os resultados têm se mostrado discrepantes. Netea *et al.* (2006), mostraram que o TLR4 desempenha um importante papel na proteção de camundongos contra a candidíase disseminada. Esse processo envolve a participação desse receptor na produção de quimiocinas como KC e MIP-2 importantes para o influxo de neutrófilos. Por outro lado, não houve uma associação entre esses receptores e produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , assim como com os mecanismos envolvidos na morte fúngica, como produção de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido. Outros autores mostraram o não envolvimento do TLR4 na resistência à infecção por *Candida*, uma vez que camundongos deficientes na

expressão desse receptor apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes aos camundongos controles e foram capazes de montar uma resposta do tipo Th1 contra esse microrganismo (Netea *et al.*, 2002; Murciano *et al.*, 2006). Os resultados também se apresentam discrepantes em relação ao papel do TLR2. Villamón *et al.* (2004) observaram que camundongos deficientes de TLR2, experimentalmente infectados por *C. albicans*, apresentaram menor sobrevivência quando comparados a animais controle, concluindo que a expressão desse receptor é crucial para a proteção dos camundongos contra candidíase disseminada. A produção *in vitro* de TNF- α e MIP-2 por macrófagos de camundongos TLR2^{-/-}, em resposta a *C. albicans*, foi significativamente inibida nesses animais o que poderia contribuir para a diminuição do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. No entanto, a fagocitose das leveduras e produção de reativos intermediários do oxigênio (ROIS) não foi afetada nos camundongos TLR2^{-/-}. Em outro estudo, esses mesmos autores observaram que no início da infecção por *C. albicans*, a produção de citocinas como TNF- α , IL-12 e IFN- γ , foi significativamente inibida nos camundongos deficientes de TLR2 (Villamón *et al.*, 2004).

Outros estudos mostraram que animais TLR2^{-/-} são mais resistentes a candidíase disseminada do que animais normais, sendo esse processo, associado a um aumento da quimiotaxia e capacidade fungicida dos macrófagos. Os autores não encontraram diferenças quanto à produção de TNF- α , IL-1 e IL-6, porém, a produção de IL-10 foi fortemente inibida nos animais TLR2^{-/-}, achado que esteve associado com a diminuição de células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ (Treg). Os autores concluíram que a *C. albicans* escapa das defesas do hospedeiro através de sinais mediados pelo TLR2 (Netea *et al.*, 2002). Enquanto os resultados em relação à participação de TLR2 e TLR4 nos mecanismos de resistência ou suscetibilidade à infecção com *C. albicans* são ainda conflitantes, o envolvimento das moléculas MyD88 nos mecanismos de proteção contra esse fungo encontra um grande suporte na literatura (Villamón *et al.*, 2004, Marr *et al.*, 2003). Resultados conflitantes também tem sido observados em relação à participação dos TLRs na infecção por *C. neoformans* e *A. fumigatus*. Estudos têm mostrado que a glicuronoxilomanana (GXM) o principal componente da cápsula do *C. neoformans* liga-se às células via CD14 e TLR4. No entanto, esse

processo resulta em uma ativação incompleta dessas células, com consequente produção inadequada de TNF- α (Shoham *et al.*, 2001). Outros estudos mostraram que MyD88 e TLR2, mas não TLR4 estão envolvidos na proteção contra o *C. neoformans* (Yauch *et al.*, 2004). Esses mesmos autores demonstraram que embora a GXM seja um ligante importante para TLR2, TLR4 e CD14, esses receptores tem uma participação mínima na resposta a infecção pelo *C. neoformans*, em relação ao importante papel desempenhado pela molécula MyD88. Corroborando com esses dados, estudos posteriores (Nakamura *et al.*, 2006) mostraram que tanto o TLR2 como o TLR4 contribuem de forma bastante discreta para os mecanismos de proteção do hospedeiro contra esse fungo.

Outros estudos têm mostrado que CD14 e TLR4 desempenham um importante papel no reconhecimento de hifas do fungo *A. fumigatus* assim como no processo de sinalização para a produção de TNF- α , por monócitos (Wang *et al.*, 2001). Antígenos de *A. fumigatus* induzem a ativação de células dendríticas imaturas humanas e polimorfonucleares (PMN), via TLR2 e TLR4 (Braedel *et al.*, 2004, Meier *et al.*, 2003). De forma semelhante, tanto conídios, como hifas do fungo induzem a translocação do NF- κ B liberando citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e MIP-2 via ligação tanto a TLR2 como TLR4 (Meier *et al.*, 2003). Por outro lado, outras pesquisas mostraram que o fungo estimula as defesas inatas do hospedeiro por mecanismos independentes de TLR2 e TLR4 (Dubordeau *et al.*, 2006). Netea *et al.* (2003), demonstraram que tanto conídios e hifas de *A. fumigatus* são capazes de estimular a produção de citocinas via TLR2, enquanto que somente o conídio estimula as células via TLR4, resultando em uma importante produção de IL-10, processo que sugere um mecanismo de escape do fungo.

Ao lado dos TLRs, os receptores do tipo lectinas como o DC-Sign (“Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin”) o receptor de manose (MR) e dectina-1 são potencialmente importantes no reconhecimento e funções das células fagocitárias em resposta aos fungos, uma vez que reconhecem carboidratos e glicoproteínas, moléculas altamente presentes nas superfícies desses microrganismos (Robinson *et al.*, 2006). Dentre

esses PRRs, destaca-se o dectina-1, com importante papel no reconhecimento de β -glucanas e conseqüentemente na resposta imunológica a infecções fúngicas (Dennehy e Brown, 2007).

Diversos estudos demonstram que o dectina-1 é importante na resposta a fungos mediada por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Goodridge *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2007). Estudos pioneiros mostraram que o dectina-1 está envolvido na resposta pró-inflamatória de macrófagos alveolares ao *A. fumigatus* (Steele *et al.*, 2005).

Estudos posteriores mostraram o papel fundamental desse receptor no reconhecimento de β -glucanas de *C. albicans*, com conseqüente desenvolvimento de uma resposta inflamatória e restrição da disseminação fúngica (Taylor *et al.*, 2007).

Outros trabalhos mostraram que o reconhecimento de PAMPS fúngicos pode envolver a interação de dectina-1 com TLRs. Nesse sentido dectina-1 interage com TLR2 para induzir maior liberação de citocinas por macrófagos e células dendríticas (Gantner *et al.*, 2003, Dennehy *et al.*, 2007). Netea *et al.*, (2006), mostraram que *C. albicans* induz a produção de citocinas por monócitos e macrófagos através da ligação a diferentes tipos de receptores cada um reconhecendo uma das estruturas que forma as paredes das células fúngicas. Polímeros do tipo manana são reconhecidos por receptores de manose, e β -glucanas por dectina-1 e TLR2, demonstrando que a colaboração no reconhecimento de componentes fúngicos distintos por diferentes classes de receptores da resposta imune inata é crucial para o desenvolvimento da resposta inflamatória.

Outros estudos demonstraram que a forma de levedura ativa células fagocíticas por meio da combinação de TLR2 e dectina-1, levando ao aumento da ativação de fatores de transcrição como o NF κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias, importantes para o controle da infecção. Por outro lado, as formas filamentosas não interagem com o dectina-1, ativam as células apenas via TLR2, induzindo um estado de supressão da resposta inflamatória, que leva a um não controle da infecção (Heinsbroek *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* mostraram que o reconhecimento da *C. albicans* pelas células dendríticas via dectina-1 pode

resultar na ativação de células Th17 com alto potencial inflamatório (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007).

O papel dos PRRs, particularmente os TLRs, nos mecanismos de resistência e ou susceptibilidade a infecção por *P. brasiliensis* também tem sido investigado. Calich *et al.* (2008), usando camundongos TLR4 deficientes e nocautes para TLR2 mostraram que tanto o TLR2 como o TLR4 estão envolvidos no reconhecimento do fungo. Esse reconhecimento resulta em um aumento da capacidade fagocítica com infecção de macrófagos e secreção de NO. No entanto, esse processo parece não levar a uma eficiente atividade macrofágica e diminuição significativa da carga fúngica, pois tanto animais normais quanto os deficientes apresentaram a mesma taxa de sobrevivência à infecção. Animais nocautes para a molécula MyD88 apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente menor quando comparada a dos animais normais não nocauteados. Em conjunto, os resultados mostram uma importância das moléculas MyD88 no processo de ativação das células fagocitárias que culmina com maior destruição fúngica e conseqüentemente maior resistência à infecção e que, ao contrário, o TLR4 e TLR2 parecem estar envolvidos nos mecanismos de virulência do fungo. Nesse sentido, Ferreira *et al.* (2007) relatam que em animais suscetíveis, a diferenciação de células dendríticas regulatórias que secretam altas concentrações de IL-10 e baixas de IL-12 ocorrem via ativação de TLR2 e receptores do tipo dectina.

Em relação às moléculas MyD88, resultados diferentes foram detectados por Gonzalez *et al.* (2008), uma vez que camundongos nocauteados para a expressão dessa molécula apresentaram a mesma carga fúngica, assim como, igual capacidade de liberarem citocinas pró-inflamatórias, levando a conclusão de que essa molécula não é essencial para os envios dos sinais celulares que culminam com maior destruição fúngica e conseqüente proteção contra a infecção. Em outros estudos, (Loures *et al.*, 2009) mostraram que o TLR2 desempenha um papel protetor durante a infecção pulmonar com o *P. brasiliensis*, uma vez que esse receptor controla negativamente a resposta inflamatória exacerbada mediada por Th17, altamente deletéria ao tecido pulmonar. Da mesma forma, mecanismos sinalizadores iniciados por TLR4 também levam a

infecção pulmonar severa associada com resposta pró-inflamatória induzida por Th17 associada à diminuição de células Treg (Loures *et al.*, 2010).

Em relação ao envolvimento desses receptores na ativação de células humanas, Bonfim *et al.* (2009) avaliaram a expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos e neutrófilos de indivíduos saudáveis após estimulação de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, e sugeriram a participação de ambos os receptores no reconhecimento, internalização e conseqüente ativação da resposta imune contra o fungo.

Estudos em nosso laboratório, avaliando o papel dos receptores TLRs, na atividade de neutrófilos humanos desafiados com a cepa 18 de *P. brasiliensis* sugerem que a interação do fungo com os receptores TLR2 e TLR4 pode ser considerada um mecanismo de patogenicidade, uma vez que esse fungo usa o TLR2 e principalmente o TLR4 para a sua entrada nas células e escapar das suas funções efetoras, através da produção de IL-8 e IL-10 (Acorci-Valério *et al.*, 2010). Nakaira-Takahagi *et al.* (2010) mostraram que tanto o fungo, como a gp43, seu principal antígeno, são capazes de modular a expressão de TLR2 e TLR4 e conseqüente produção de citocinas pró e antiinflamatórias por monócitos humanos.

A análise dos trabalhos acima revela a necessidade de ampliar os estudos sobre a participação do PRRs na resposta das células fagocitárias humanas ao *P. brasiliensis*, particularmente no que se refere à participação dos receptores do tipo não TLR, com enfoque para a modulação da resposta inflamatória via citocinas.

Por outro lado, estudos nos últimos anos têm mostrado a participação dos PRRs na cascata de ativação do ácido araquidônico (AA) que resulta na liberação de eicosanóides, que da mesma forma que as citocinas, são potentes moduladores da resposta imune inata e adaptativa (Alvarez *et al.* 2010)

Eicosanóides são lipídios biologicamente ativos derivados da oxidação do AA, que por sua vez, se originam de fosfolipídios da membrana celular, através da ação de enzimas denominadas fosfolipases (PLs), especificamente a fosfolipase A₂ (cPLA₂). Em seguida o AA é metabolizado pela ação de diferentes enzimas dando origem às prostaglandinas (PGs) e aos leucotrienos (LTs) (Smith & Dewitt 1996).

As PGs são produzidas via ação da enzima prostaglandina G/H sintase (ciclooxigenase), originando um precursor comum, a prostaglandina H (PGH), que serve como substrato para um número de diferentes hidrolases e sintases específicas que produzem as diferentes classes de prostaglandinas (PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}) e tromboxanas (Flynn 1995, Marks 1999). Na resposta imune, as PGs, particularmente as PGE₂, exercem diversos efeitos sobre a regulação e atividade das células T, principalmente em relação à produção de citocinas. Embora existam trabalhos mostrando que a PGE₂ aumenta a síntese de INF-γ por células Th1 estimuladas por antígenos (Bloom *et al.*, 1999), seu efeito preponderante sobre as células parece ser o de supressão. Esse mediador inibe de uma forma bastante acentuada, a produção de citocinas liberadas por Th1, como IFN-γ e IL-12, mas aumenta a produção de citocinas de padrão de resposta Th2, como a IL-4, IL-5 e IL-10 (Hilkens *et al.*, 1996; Phipps *et al.*, 1991). Inibe a proliferação das células CD₈⁺ (Hendricks *et al.*, 2000) e diminui a produção de IFN-γ por essas células (Ganapathy *et al.*, 2000) e regula de forma bastante acentuada, a produção de citocinas por macrófagos ativados, inibindo a produção de TNF-α, IL-1β e IL-12, assim como a expressão de receptores para essas citocinas, aumentando, no entanto, a produção de IL-10 (Gazzinelli *et al.*, 1992a; Gazzinelli *et al.*, 1992b).

A PGE₂ exerce também um importante efeito sobre células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas e macrófagos. Em relação as primeiras, os resultados são conflitantes uma vez que, trabalhos têm demonstrado que esse mediador aumenta a produção de IL-12 por essas células na ausência de estimulação por LPS (Reiser *et al.*, 1997). No entanto, inibe a produção de IL-12 por células dendríticas da medula óssea (Harizi *et al.*, 2001) e aumenta a produção de IL-10 (Kalinski *et al.*, 1997). Assim, a presença de PGE₂ no primeiro contato das células TCD₄⁺ com o antígeno induz a diferenciação dessas células em Th2. Atua ainda sobre células NK, inibindo a produção de INF-γ, induzida por IL-12 e IL-18 (Walker e Rotondo, 2004).

Os efeitos das PGs citados acima, particularmente os que demonstram uma inibição da atividade de células T, têm levado os pesquisadores a investigar o papel desse mediador nos mecanismos de imunossupressão detectados em algumas infecções. Nesse sentido, Schleifer & Mansfield (1993) demonstraram

que a ativação de macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma brucei rhodesiense* leva à liberação de NO e PG que inibem a resposta proliferativa de células T. De forma semelhante, Pinge-Filho *et al.* (1999), demonstraram que grandes quantidades de PGE₂, TNF- α e NO são produzidas durante a infecção por *T. cruzi* e que esses mediadores estão envolvidos no controle das respostas linfoproliferativa e produção de citocinas na infecção por esse microrganismo. Assim, o TNF- α estimula a síntese de PG e NO que inibem a síntese de TNF- α . A inibição combinada de PG e NO restaura a capacidade proliferativa das células em resposta a concanavalina-A e antígenos.

Barros-Mazon *et al.* (2004), demonstraram que existe uma regulação diferenciada da resposta linfoproliferativa a antígenos do *T. cruzi* em pacientes com a forma cardíaca ou indeterminada da doença de Chagas. A IL-10 está envolvida na supressão da resposta em pacientes com a forma cardíaca, enquanto que as PGs regulam a linfoproliferação celular tanto de pacientes com forma cardíaca, como com a forma indeterminada da doença.

Estudos em modelo experimental murino de tuberculose demonstraram uma participação significativa da PGE₂ na patogênese da tuberculose pulmonar, uma vez que durante a fase inicial da infecção, foram detectadas baixas concentrações de PGE₂ associadas à expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), permitindo o controle do crescimento do bacilo. Já, durante uma fase mais tardia da infecção, altas concentrações de PGE₂ estiveram associadas com a diminuição da expressão de IFN- γ , TNF- α , iNOS e alta expressão de IL-4, permitindo a progressão da doença (Moreno *et al.*, 2002).

Estudos semelhantes aos descritos acima foram realizados em modelo experimental de PCM (Michelin *et al.*, 2002). Os autores demonstraram que durante a infecção ocorre uma grande liberação de PGE₂ que medeia à imunossupressão em fases precoces da infecção por um mecanismo dependente de IL-4 e IL-10.

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do AA, através da ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO), formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) que é transformado em leucotrieno A₄ (LTA₄) (Peters-Golden & Coffey, 1998). O LTA₄, por sua vez é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando leucotrieno B₄ (LTB₄) ou então receber um resíduo de

glutathiona gerando o leucotrieno C₄ (LTC₄). A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC₄ dá origem ao leucotrieno D₄ (LTD₄) e com a retirada da glicina do LTD₄ forma-se o leucotrieno E₄ (LTE₄) (Peters-Golden & Coffey, 1998).

O LTB₄ estimula várias funções de leucócitos, incluindo a fagocitose (Mancuso *et al.*, 1998), secreção de espécies reativas do oxigênio (Bjerrum & Borregaard, 1989; Lafars *et al.*, 1999;) e do nitrogênio (Talvani *et al.*, 2002; Larfars *et al.*, 1999), liberação de enzimas lisossomais (Serhan *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2002) e de defensinas (Flamand *et al.*, 2004).

Estas ações na ativação celular e regulação da atividade microbicida de fagócitos sugerem a importância dos LTs na proteção do hospedeiro contra diferentes agentes infecciosos. Assim, alguns autores demonstraram que o aumento na produção de LTs em macrófagos de camundongos infectados por *Klebsiella pneumonia*, está diretamente relacionado à capacidade microbicida e ativação da enzima NADPH oxidase (Bailie *et al.*, 1996; Serezani *et al.*, 2005).

Talvani *et al.* (2002) descreveram que a adição de LTs nas culturas de macrófagos peritoneais murinos, induzem produção de NO, aumento da síntese de TNF- α e da atividade microbicida contra o *T. cruzi*. Camundongos resistentes à *Leishmania amazonensis* também produzem maiores níveis de LTB₄ quando comparados a cultura de células dos animais suscetíveis que não produzem LTB₄ e não desenvolvem atividade microbicida (Serezani *et al.*, 2006). Peres *et al.* (2007) mostraram o papel dos LTs na regulação da resposta protetora Th1 na infecção *in vivo* com *M. tuberculosis*, demonstrando que esses mediadores tem papel protetor na resposta do hospedeiro, aumentando a atividade micobactericida. Coffey *et al.* (2004) observaram que a síntese de LT endógeno por PMNs tem um importante papel na capacidade bactericida destas células.

Em relação a infecções fúngicas, estudos têm mostrado o papel protetor dos leucotrienos na histoplasmose pulmonar murina (Medeiros *et al.*, 2004). Na PCM, estudos demonstraram que a infecção *in vitro* ou *in vivo* com o *P. brasiliensis* induz a produção de LTs. Nesse estudo, camundongos susceptíveis (B10.A) apresentam maiores níveis de LTs nos pulmões bem como aumento da infecção, quando comparados com os animais resistentes. Além disso, foi avaliado o efeito do inibidor de LTs (MK-0591) na infecção *in vitro* e *in vivo* com o *P. brasiliensis*. O tratamento de macrófagos alveolares com MK-0591 reduziu

significativamente a recuperação de células leveduriformes do fungo; por outro lado, o tratamento *in vivo* dos animais com MK-0591 não alterou a severidade da PCM pulmonar. Assim, os autores sugerem que os LTs atuam na resposta de macrófagos após a interação com o fungo, como importante modulador da resposta destas células (Ribeiro & Calich, 2005).

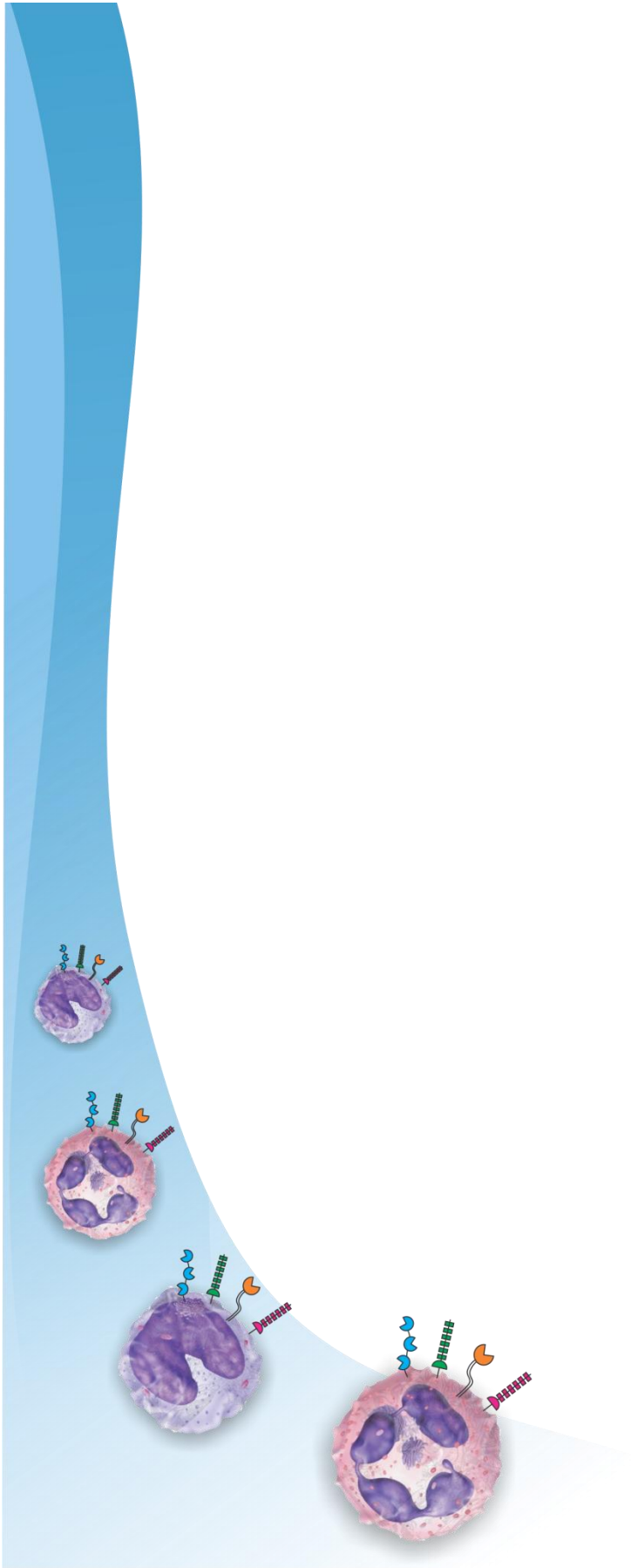
Como já citado, há grandes evidências que a liberação de AA e a produção sequencial de eicosanóides são resultados da ligação de PRRs com seus respectivos ligantes. Nesse sentido, estudos têm mostrado que os principais PRRs envolvidos no metabolismo do AA em neutrófilos e macrófagos são o dectina-1, o receptor do “tipo 3” do sistema complemento (CR3), o receptor para manose (MR) , o para a fração Fc de IgG (Fc γ R) e os receptores acoplados a proteína G (GPCR), enquanto que para células dendríticas, os principais receptores são dectina-1 e DC-SIGN (Alvarez *et al.*, 2010)

Nesse sentido (Valera *et al.* 2007) observou que células PMN humanas estimuladas com polímeros de mananas e peptidoglicano (PNG) (polímero característico da parede celular de bactérias Gram + e Gram -) estimulou alta liberação de AA e conseqüente produção de LTB₄ e PGE₂. A pré-incubação dessas células com anticorpo monoclonal anti-TLR2 não alterou a produção de eicosanóides sugerindo que esse receptor não está envolvido na resposta ao PNG.

Suram *et al.* (2010) buscando identificar os receptores de macrófagos murinos que se ligam a *C. albicans* e que medeiam a ativação do grupo IV-A da fosfolipase A2 citosólica, verificou que os receptores dectina-1, e a molécula adaptadora MyD88 regulam o início da liberação de AA e eicosanóides em resposta a *C. albicans*. Os resultados também implicam a influência do dectina-2 na ativação da cPLA₂.

Nos últimos anos, estudos em nosso laboratório têm objetivado avaliar o papel de eicosanóides sobre a atividade das células fagocitárias em resposta ao *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram que o *P. brasiliensis* induz monócitos humanos a produzirem PGs que de uma forma autócrina inibem a atividade fungicida dessas células. O mecanismo de ação das PGs envolve diminuição da produção de TNF- α pelas células, com conseqüente redução dos níveis de H₂O₂, o metabólito envolvido na destruição do fungo por monócitos humanos. Por outro

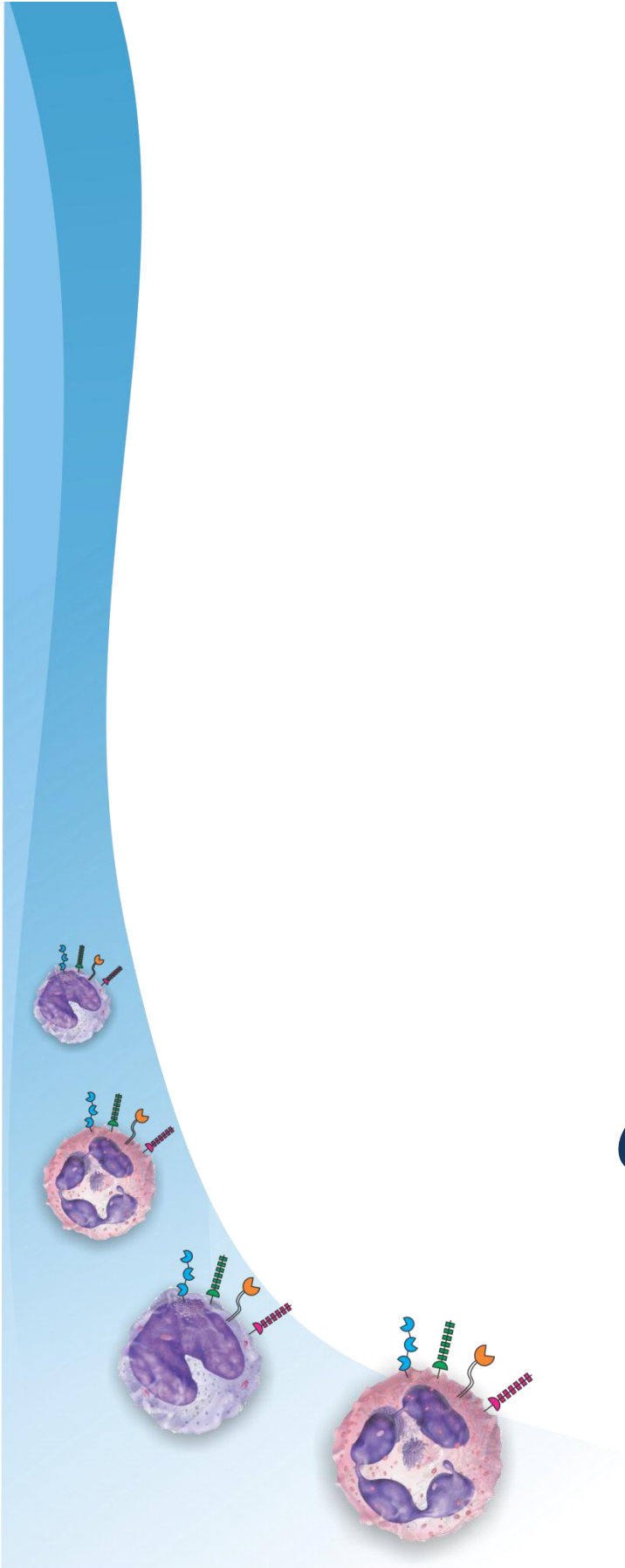
lado, estudos preliminares em nosso laboratório, mostraram que o fungo induz a produção de LTs que, ao contrário das PGs, modulam positivamente a atividade fungicida de monócitos humanos. Esses resultados deixam clara a necessidade de aprofundarmos nossos estudos no sentido de entender os mecanismos moleculares envolvidos na ativação do metabolismo do ácido araquidônico pelas células fagocitárias em resposta ao *P. brasiliensis*. Nesse sentido, torna-se extremamente importante a identificação dos PRRS envolvidos na ativação do metabolismo do AA em células fagocitárias e consequente produção de PGs e LTs em resposta a esse fungo.



Objetivo

4. Objetivo

Avaliar a participação dos receptores TLR2, receptor de manose (MR), dectina-1 e TLR4, na produção de citocinas pró e antiinflamatórias e dos eicosanóides PGE₂ e LTB₄, por neutrófilos e monócitos humanos em resposta a cepas de *P. brasiliensis* de alta e baixa virulência.



Casuística e Métodos

5. Casuística e Métodos

5.1 Casuística.

Foram avaliadas células de indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento, tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Of. 315/11-CEP).

5.2 Culturas de monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

Foram coletados 20ml de sangue periférico por indivíduo em tubos estéreis contendo 10U/ml de heparina (Liquemine-Roche). As células foram obtidas por meio da centrifugação dos tubos em gradiente de Histopaque (Sigma-Aldrich), densidades 1083 e 1119 g/mL a 360g, 21°C, por 30 minutos. Os anéis ricos em células mononucleares ou polimorfonucleares foram coletados separadamente, lavados e ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 40 µg/ml de gentamicina e 10% de soro heterólogo inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC). A contagem, identificação e viabilidade dos neutrófilos foi realizada através da coloração em azul tripan e a dos monócitos através da incorporação pelo vermelho neutro. Em seguida, a concentração foi ajustada para 1×10^6 neutrófilos ou monócitos/ml de MCCC, plaqueada em placas de macroculturas de fundo chato de 24 orifícios (1000µl/orifício) seguida de incubação em tensão de 5% de CO₂ e a 37°C com diferentes bloqueios e/ou estímulos, na dependência do ensaio a ser realizado. Em relação as culturas de monócitos, após duas horas de incubação com MCCC e antes do tratamento com os bloqueios e estímulos, as células não aderentes foram retiradas.

5.3- Culturas de *P. brasiliensis*

Foram utilizadas as cepas 18 e 265 de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) mantidas em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY, (2% glicose, 1% peptona e 0,5% extrato de levedura) à 37°C, em tubos de 20 x 20 mm, com subcultivos semanais.

5.4- Obtenção da suspensão de *P. brasiliensis* inativados

Culturas de Pb 18 ou 265 cultivadas de acordo com o item 5.3 por um período de 5 ou 6 dias foram coletadas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10 ml de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37° C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo *Neubauer* em microscópio com contraste de fase, seguido do ajuste da concentração para 4×10^4 células leveduriformes/ml. Após o ajuste, a suspensão fungica foi colocada em tubos do tipo *strip*, hermeticamente fechados, e submetida a ciclos de aquecimento em termociclador (três ciclos de aquecimento que iniciaram na temperatura de 25°C e chegaram a um pico de 60°C, permanecendo por três minutos, antes de regressar a temperatura inicial para o início de um novo ciclo).

Esse procedimento foi adotado, pois em trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, comprovamos a capacidade de cepas vivas de *P. brasiliensis* produzirem eicosanoides, fato esse que poderia comprometer a análise dos ensaios relativos à produção de eicosanoides somente pelas células.

5.5. Cinética da expressão de receptores constitutivos de monócitos e neutrófilos.

As culturas de monócitos e neutrófilos obtidas de acordo com o item 5.2 foram incubadas somente com MCCC nos períodos de 2, 4, 8, 12, 18 horas e avaliadas quanto à expressão dos receptores TLR2, MR, Dectina-1 e TLR4. Após os períodos respectivos, as células foram transferidas para tubos *Falcon* específicos para citômetro (BD Labware) e centrifugadas a 350g por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de solução eletrolítica (ISOTON) e incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 (Biolegend) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-MR (Biolegend) conjugado com alofococianina (APC*), anti-Dectina-1 (R&D Systems) conjugado com ficoeritrina (PE) e anti-TLR4 (Biolegend) conjugado com PE, durante 30 minutos. Para cada teste foi feito um tubo controle no qual as células foram incubadas com anticorpos de controle isotópico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 350g para lavagem e ressuspensas em 1mL de ISOTON e fixadas com 50µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD - Becton, Dickinson and Company) e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur™ BD - *Becton Dickinson USA*), por meio de *software* específico (*CellQuest - Becton Dickinson USA*) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares.

5.6 Avaliação da efetividade dos bloqueios dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 por citometria de fluxo.

As culturas de monócitos e neutrófilos obtidas de acordo com o item 5.2 foram incubadas em tensão de 5% CO₂ a 37°C por 12 horas, antes do início da verificação de efetividade dos bloqueios dos receptores. Após esse período foi adicionado às culturas os anticorpos monoclonais (exceto aos poços destinados ao controle positivo) anti-TLR2, anti-MR e anti-Dectina-1 em variadas concentrações (1, 2, 3 e 4µg/10⁶ células para anti-TLR2, 0,5, 1, 3 e 4µg/10⁶

células para anti-MR e 1.5, 2, 3 e 4ug/10⁶ células para anti-dectina-1). Após a adição dos anticorpos monoclonais, as culturas foram mantidas novamente por duas horas em tensão de 5% CO₂ a 37°C. Num processo seguinte, as placas de cultivo de monócitos tiveram o sobrenadante retirado e os poços lavados diversas vezes com solução gelada de descolamento celular (HyQ®tase, LGC Biotecnologia), as amostras foram recolhidas em tubos específicos para citômetro (BD Labware). Para as placas de cultivo de neutrófilos o sobrenadante foi diretamente coletado e transferido para os tubos de citometria. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 350g por 10 minutos à 4°C e, após centrifugação o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Nos tubos foram adicionados 20ul dos respectivos anticorpos conjugados com fluorocromos, descritos no item 5.5, (inclusive nos tubos de controle positivo) por 30 minutos e completados com 1ml de ISOTON . Na sequencia os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante descartado e as células marcadas foram fixadas com 50µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD - Becton, Dickinson and Company) e analisadas por citometria de fluxo. Para cada teste foi feito um tubo de controle isotópico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes.

5.7 Bloqueio dos receptores e tratamento com os estímulos.

As culturas de monócitos e neutrófilos obtidas de acordo com o item 5.2 foram incubadas em tensão de 5% CO₂ a 37°C por 12 horas antes do início dos bloqueios. Após esse período foi adicionado às culturas, anticorpos monoclonais anti-TLR2 (2ug/10⁶ células), anti-TLR4 (2ug/10⁶ células), anti-MR (2ug/10⁶ de células) e anti-Dectina-1(3ug/10⁶ de células) concentrações essas que tiveram maior índice de bloqueio verificados através do ensaio descrito em 3.6. Foi adotado um esquema que permitisse que a cada avaliação, três receptores ficassem bloqueados e somente o receptor a ser avaliado ficasse disponível. Após os bloqueios, as culturas foram tratadas ou não com uma suspensão de *P. brasiliensis*, cepas Pb18, Pb265, numa proporção fungo/célula de 1:50 por um período de 4 ou 18 horas a 37°C, em atmosfera constante de 5% de CO₂, seguido

de coleta dos sobrenadantes para avaliação dos níveis das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 e dos eicosanóides PGE₂ e LTB₄.

5.8 Avaliação da produção de citocinas e de PGE₂ e LTB₄

A produção de TNF- α , IL-10 e IL-12 foi avaliada através de ensaios de ELISA utilizando os kits comerciais da BD OptEIA™ (Human TNF-alpha ELISA Set, Human IL-12p70 ELISA Set, Human IL-10 ELISA Set) todos da BD Biosciences, San Diego. Para avaliação da produção dos PGE₂ e LTB₄ foram utilizados kits comerciais de ELISA do tipo Competitivo (Cayman Chemicals). Os testes foram realizados conforme instruções fornecidas pelos fabricantes.

5.9 Avaliação da expressão de IL-10 intracitoplasmática em neutrófilos por citometria de fluxo

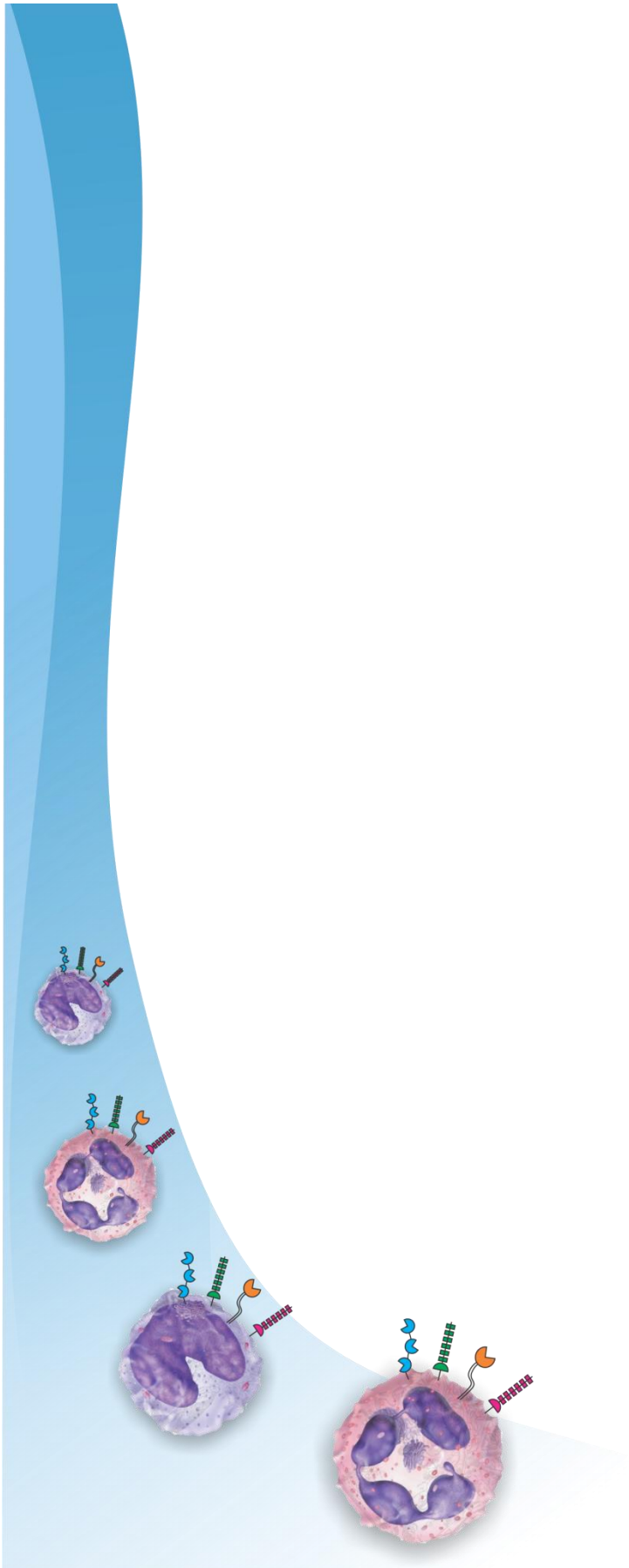
Para realização desse ensaio, com o objetivo de purificar a população de neutrófilos, a suspensão celular referente ao anel rico em células polimorfonucleares descrito em 5.2 foi submetida a separação pela técnica de beads magnéticas (“magnetic cell sorting” - MACS *Miltenyi Biotec*) associadas a anticorpo monoclonal anti CD16. Foi utilizado o kit (*MicroBeads human - Miltenyi Biotec*)

Após a separação, as células foram incubadas com os diferentes bloqueios e estímulos descritos em 5.7 por 18 horas. Seis horas antes do término do cultivo, as culturas foram tratadas com *brefeldin A* (1 μ L da solução 1000x concentrada em 999 μ L de RPMI), para impedir a liberação das citocinas do citoplasma celular. Após o período final de cultura, os sobrenadantes foram retirados e transferidos para os tubos de citometria (*Falcon*, BD - *Becton-Dickinson* USA) centrifugados por 10 minutos a 360g. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 μ L de solução A de permeabilização do *kit* Fix & Perm (*ADG Bio Research*), incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz, centrifugadas, retirados cuidadosamente os sobrenadantes e adicionado 100 μ L de solução B de permeabilização do *kit* Fix &

Perm (*ADG Bio Research*) na presença de anticorpo anti- IL-10 humano conjugado com PE (*Biolegend*) por 15 minutos na ausência de luz. As células também foram incubadas com anticorpo monoclonal controle isotípico marcado com o respectivo fluorocromo. A seguir, as células foram lavadas com ISOTON e na sequência os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante descartado e as células marcadas foram fixadas com 50 μ L de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD - *Becton-Dickinson* USA) e analisadas quanto a expressão intracitoplasmática de IL-10 por citometria de fluxo.

5.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad InStat San Diego, California – USA. Diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância para amostras dependentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer (Godfrey, 1985), assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro fosse menor que 5% ($p < 0,05$).



Resultados

6. Resultados

6.1 Avaliação da expressão constitutiva de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 em monócitos e neutrófilos.

Antes de iniciarmos os experimentos relativos ao envolvimento dos diferentes receptores na produção de citocinas e eicosanóides, tivemos necessidade de detectar o período de incubação no qual uma maior percentagem de células estaria expressando tais receptores, no sentido de garantir uma participação efetiva de cada um deles. Assim, realizamos experimentos nos quais essa avaliação foi realizada após 2, 4, 8, 12 e 18 horas de cultivo das células em MCCC sem qualquer estímulo. A figura 1 mostra os resultados relativos à percentagem de monócitos. A expressão de TLR2 foi detectada somente após 4 horas de cultura e por uma pequena percentagem das células. No entanto, as percentagens foram aumentando de forma gradativa nos períodos subsequentes atingindo número máximo de positividade após 18 horas de incubação. Em relação ao MR, a percentagem de células foi quase nula nos períodos de 2 e 4 horas, aumentando de forma considerável apenas após 8 horas de incubação, seguido de uma queda gradual nos períodos posteriores (12 e 18 horas). A expressão de dectina-1 foi detectada após 2 horas de incubação em uma pequena percentagem de células. No entanto, o número de células expressando esse receptor aumentou significativamente e de forma gradual até o último período de análise, no qual atingiu valores máximos. Em relação ao TLR4 a positividade das células também se apresentou de forma gradual, tendo seus maiores valores no período de 18 horas. Baseados nesses dados, o período escolhido para desafiar as culturas de monócitos com as duas cepas do fungo, foi após 12 horas de incubação prévia. Optamos por esse período devido à sua uniformidade em relação ao número de células que expressam os três receptores em estudo, apesar de não ser o período no qual detectamos as maiores percentagens celulares para cada um deles.

Em relação aos neutrófilos (figura 2), observamos que uma baixa percentagem dessas células expressaram TLR2 no período de 2 horas, seguido por um aumento significativo após 4, 8, 18 e principalmente 12 horas, no qual o

número de células foi máximo (aproximadamente 100%). Em relação ao MR, uma porcentagem significativa das células expressou esse receptor somente após 8 e 12 horas de incubação, seguido no entanto, por uma significativa diminuição nessas porcentagens após 18 horas. Quanto ao dectina-1, detectamos um número significativo de células expressando esse receptor, após 4 horas de incubação, seguido por um aumento gradual nos períodos subsequentes com porcentagens máximas em 18 horas. As porcentagens de células que expressaram TLR4 também aumentaram progressivamente até atingir máxima positividade em 12 horas, seguido de uma pequena queda no período posterior. Em função dos resultados acima, de forma semelhante à cultura de monócitos, optamos por escolher o período de 12 horas de incubação antes do desafio com as cepas fúngicas.

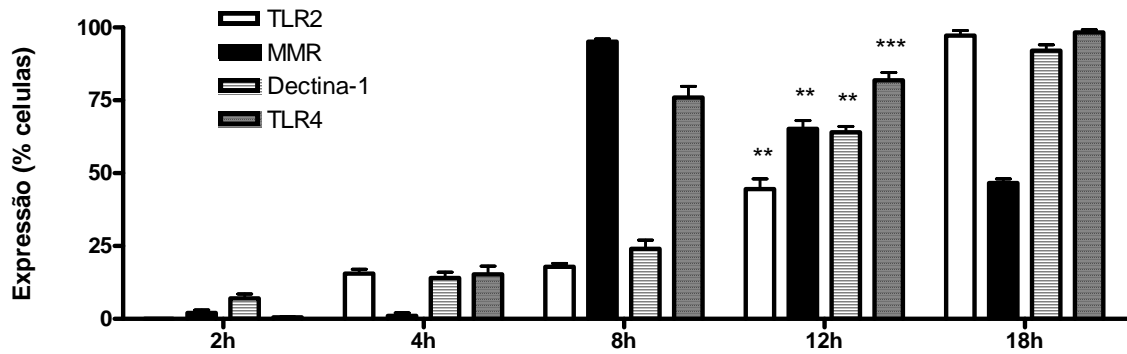


Figura 1. Porcentagem de monócitos expressando TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 após 2, 4, 8, 12 e 18 horas de incubação com meio de cultura. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. $n=10$ indivíduos. ** $p < 0.01$ x 2h, *** $p < 0.001$ x 2h

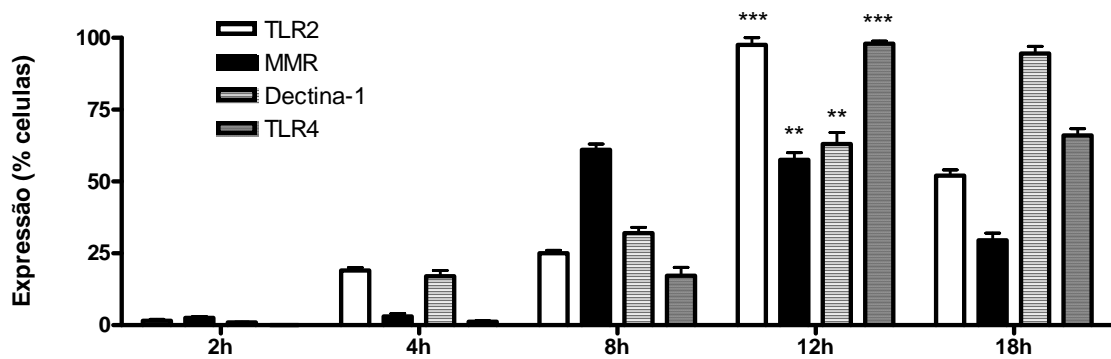


Figura 2. Porcentagem de neutrófilos expressando TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 após 2, 4, 8, 12 e 18 horas de incubação com meio de cultura. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. $n=10$ indivíduos. ** $p < 0.01$ x 2h. *** $p < 0.001$ x 2h.

6.2 Avaliação das concentrações ideais de anticorpos anti-TLR2, anti-MR, anti-dectina-1 e anti-TLR4 para a determinação do bloqueio dos respectivos receptores em monócitos e neutrófilos.

Uma vez determinados os períodos ideais de cultura para a expressão dos receptores a serem testados, houve necessidade de estabelecermos quais concentrações dos anticorpos monoclonais anti-TLR2, anti-MR, anti-dectina-1 e anti-TLR4 seriam mais efetivas nos bloqueios dos respectivos receptores. Testamos as concentrações de 1, 2, 3 e 4ug para anti-TLR2, 0.5, 1, 3 e 4ug para anti-MR, 1.5, 2, 3 e 4ug para anti-dectina-1 e 1, 2, 3 e 4ug para anti-TLR4. As figuras 3 a 10 mostram os resultados obtidos com as concentrações que determinaram os melhores índices de bloqueio, que foram $2\mu\text{g}/10^6$ células para anti-TLR2, anti-MR e anti-TLR4 e $3\mu\text{g}/10^6$ células para anti-dectina-1.

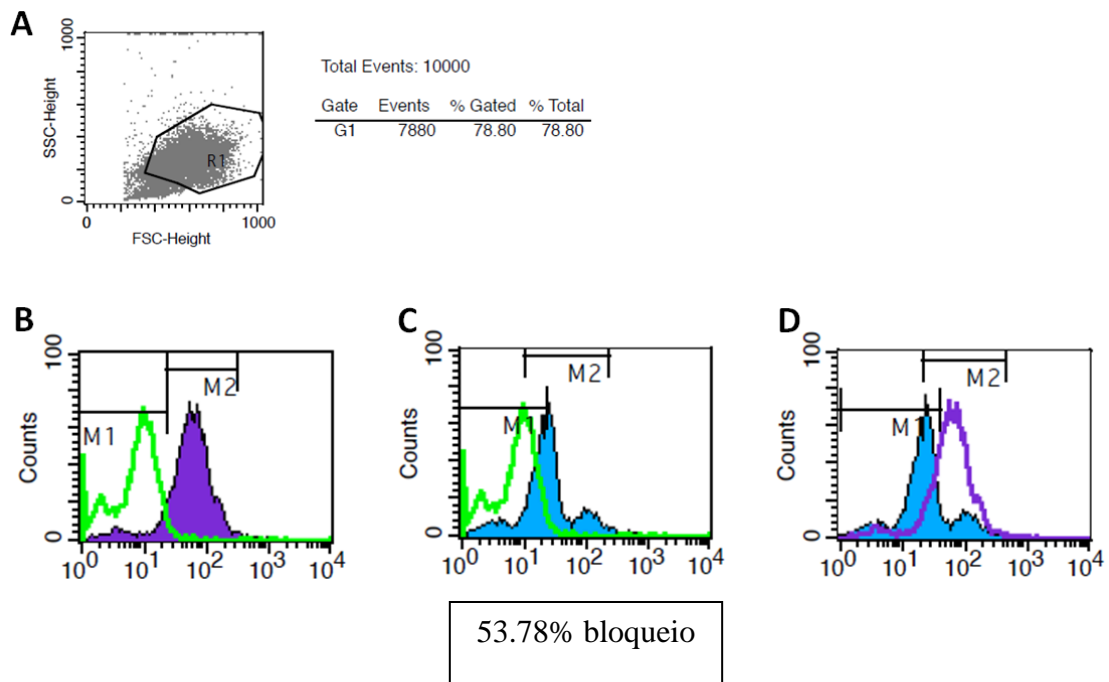


Figura 3. Avaliação da expressão e bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal em monócitos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotópico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (azul) Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

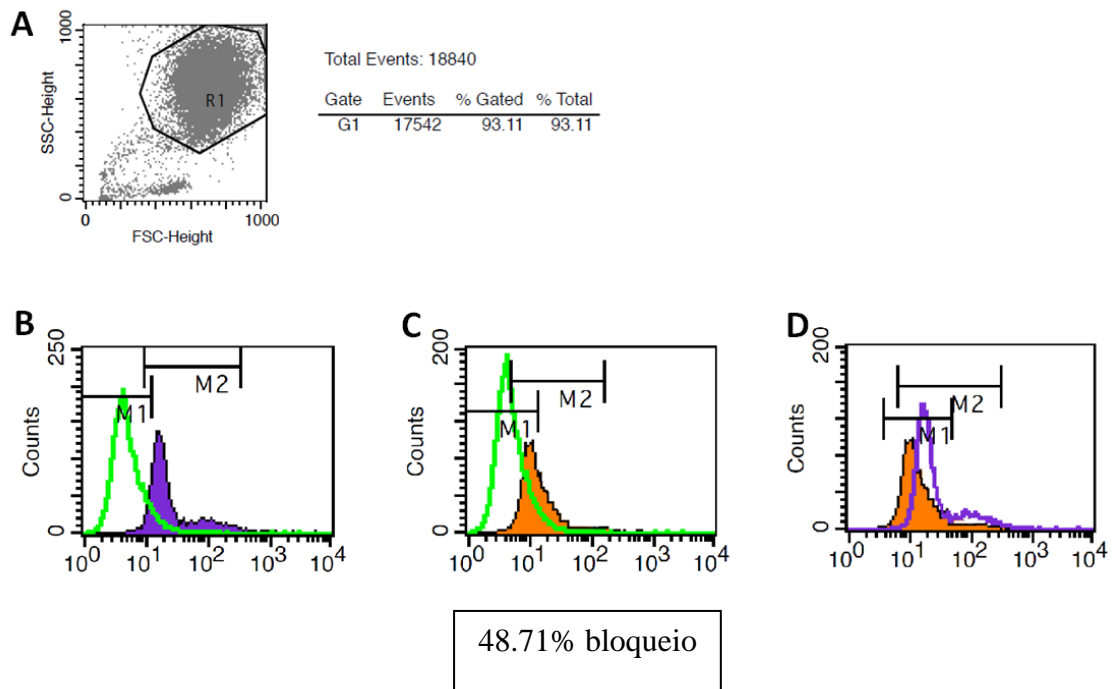


Figura 4. Avaliação da expressão e bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal em neutrófilos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotópico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (laranja). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

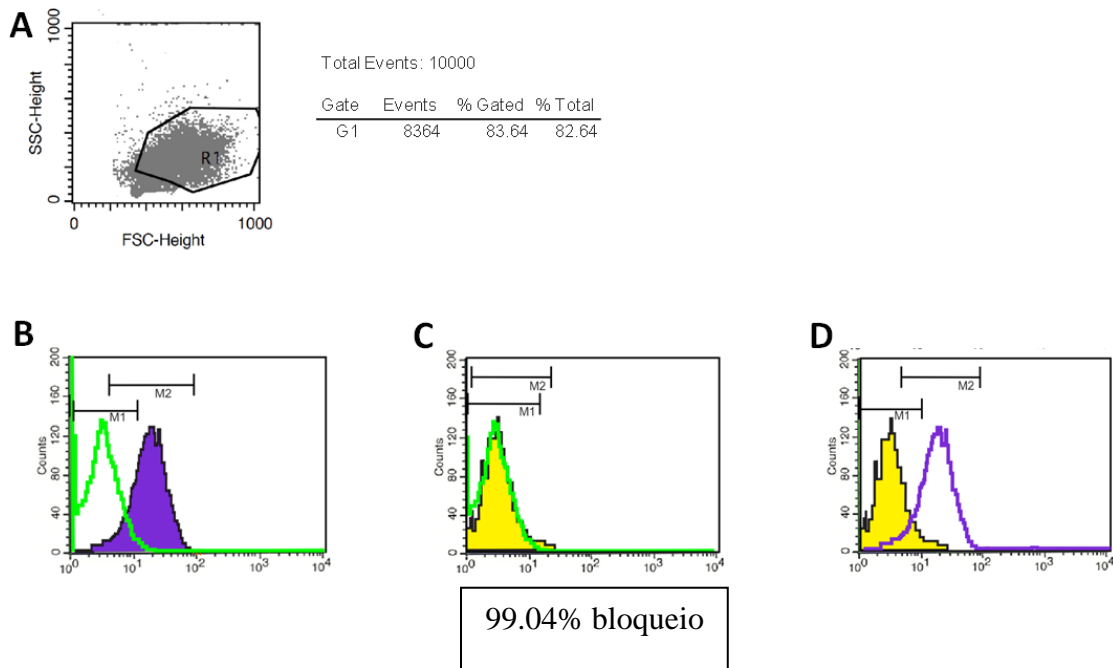


Figura 5. Avaliação da expressão e bloqueio de MR com anticorpo monoclonal em monócitos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotípico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (amarelo). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

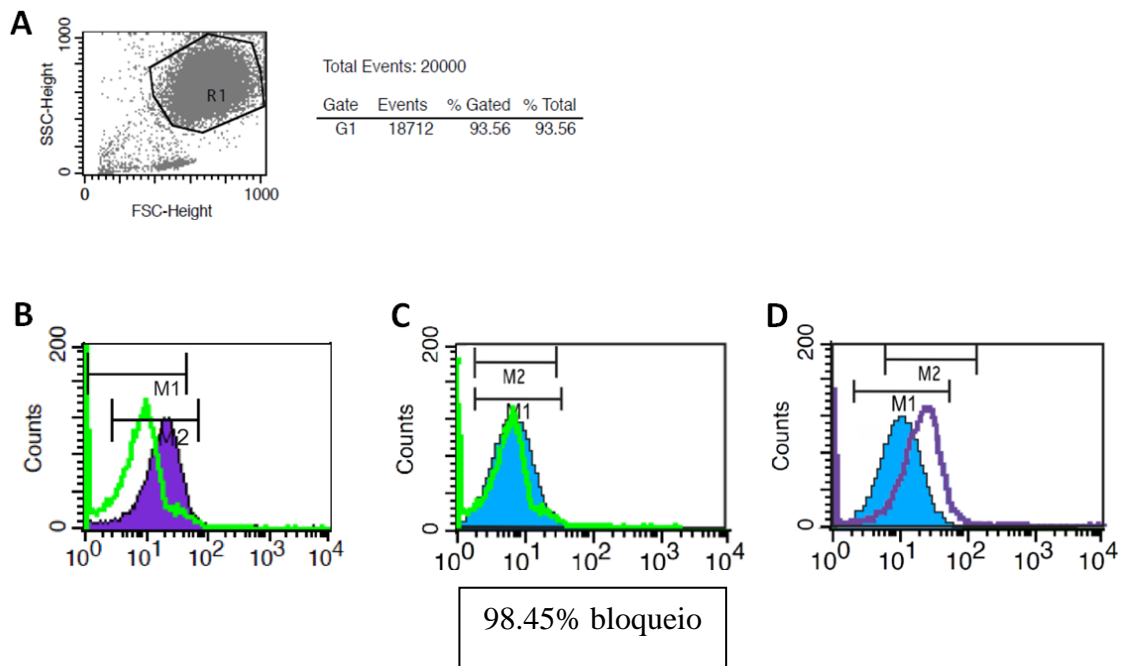


Figura 6. Avaliação da expressão e bloqueio de MR com anticorpo monoclonal em neutrófilos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotípico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (azul). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

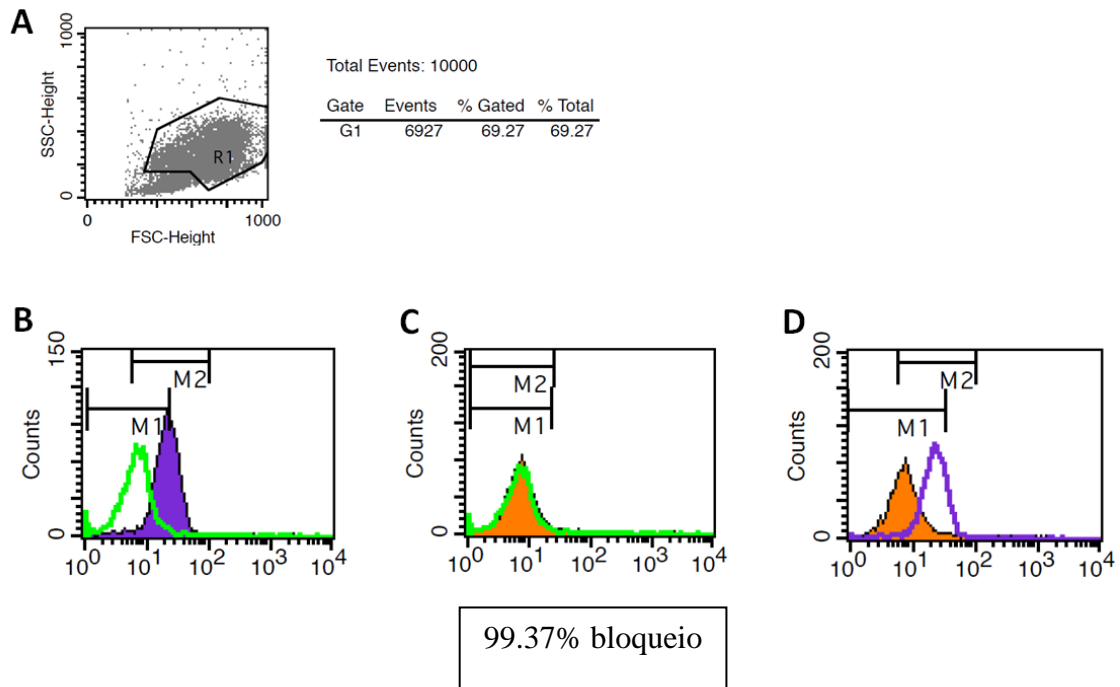


Figura 7. Avaliação da expressão e bloqueio de Dectina-1 com anticorpo monoclonal em monócitos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotópico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (laranja). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

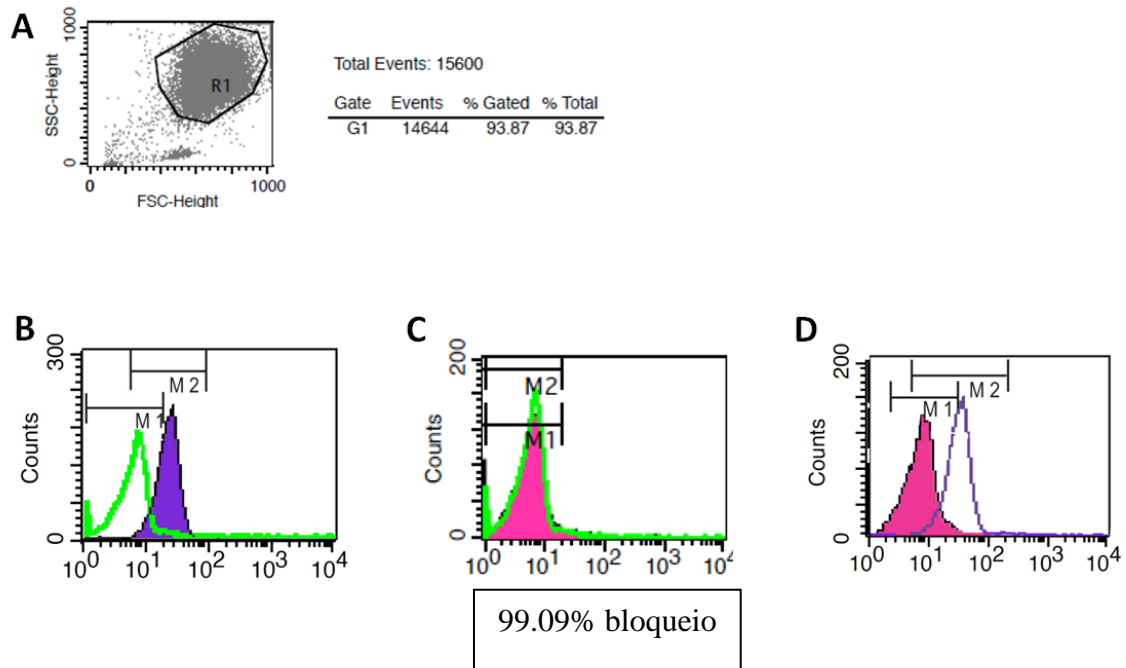


Figura 8. Avaliação da expressão e bloqueio de Dectina-1 com anticorpo monoclonal em neutrófilos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotópico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (laranja). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

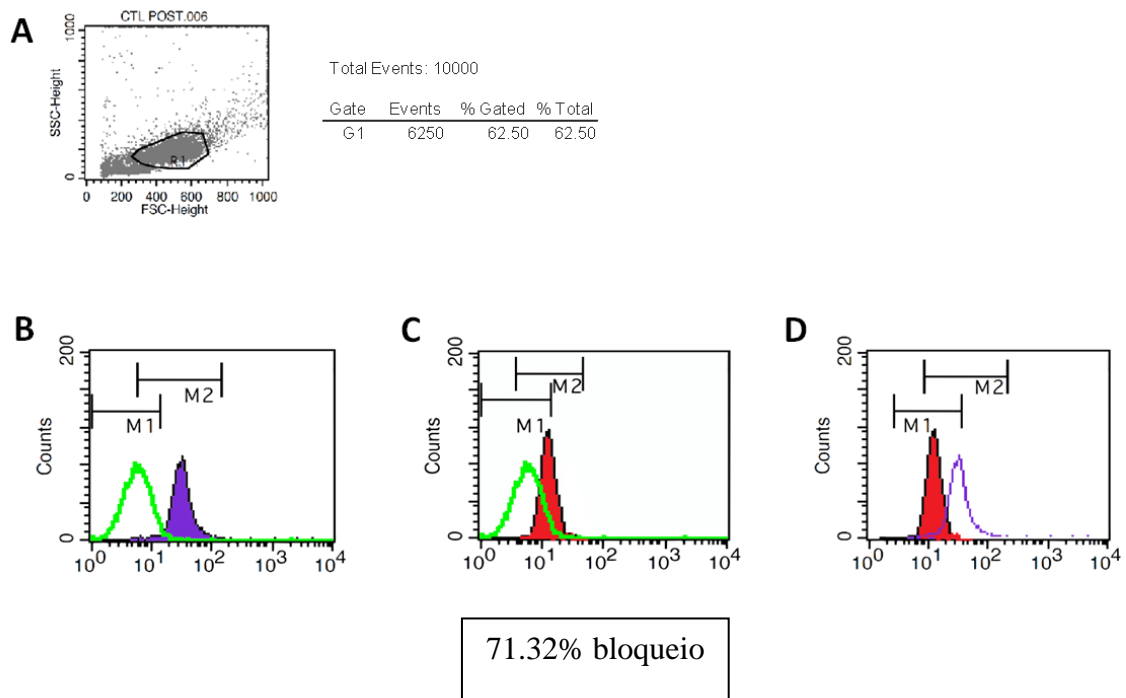


Figura 9. Avaliação da expressão e bloqueio de TLR4 com anticorpo monoclonal em monócitos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotópico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (vermelho). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

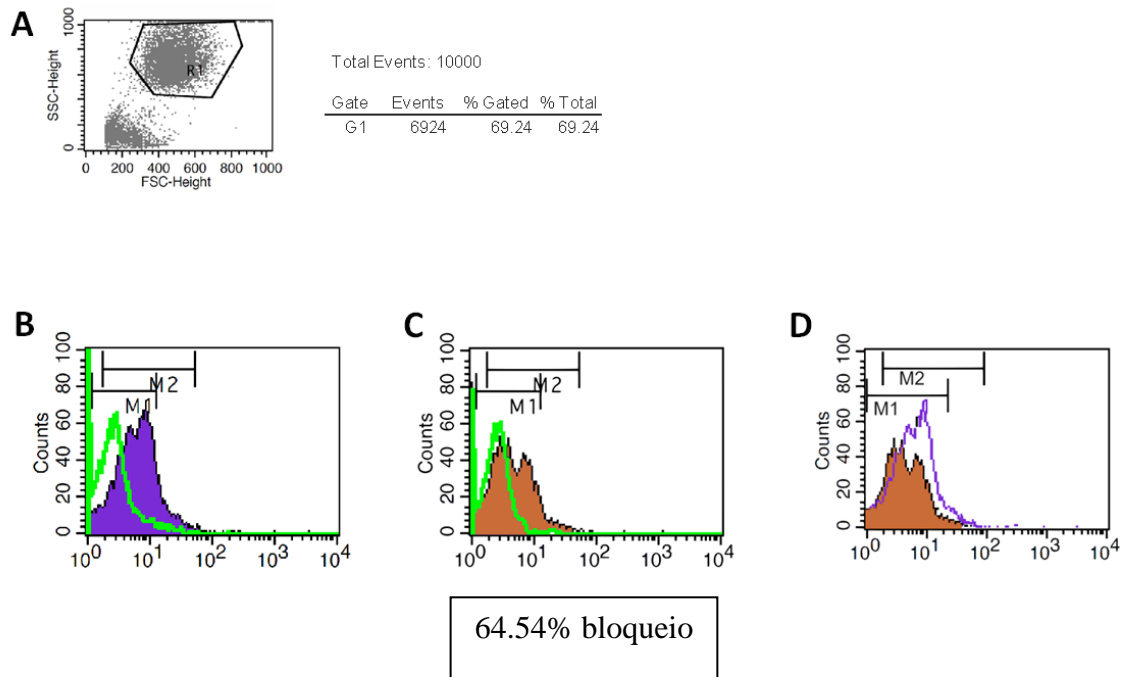


Figura 10. Avaliação da expressão e bloqueio de TLR4 com anticorpo monoclonal em neutrófilos. Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (**A**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (**R1**). **B**, **C** e **D** representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotípico (verde), controle positivo (roxo) e índice de bloqueio (marrom). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais.

6.3 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de TNF- α por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Os resultados referentes ao envolvimento dos quatro receptores na produção de TNF- α por monócitos desafiados com Pb 18 ou Pb 265, por 4 e 18 horas podem ser analisados nas figuras 11 e 12, respectivamente.

Nos ensaios de 4 horas, observamos que baixos níveis da citocina foram produzidos por monócitos controles não desafiados com o fungo. No entanto, após o desafio com as duas cepas do fungo, detectamos um aumento significativo desses níveis, mostrando a capacidade de o *P. brasiliensis* induzir a produção de TNF- α . Em relação à participação dos receptores, observamos que nos experimentos nos quais todos os receptores foram bloqueados houve uma significativa diminuição na produção da citocina, particularmente em resposta a cepa 18, mostrando o envolvimento de um ou mais dos receptores testados. Os experimentos realizados para avaliar a participação individual dos receptores mostraram que as respostas referentes ao MR e dectina-1 foram semelhantes à detectada com o bloqueio total dos receptores, sugerindo a não participação dos mesmos na produção da citocina. No entanto, quanto à participação individual de TLR2 e TLR4, os níveis foram bastante semelhantes aos detectados nos ensaios sem bloqueio, o que indica fortemente a participação desses receptores na produção de TNF- α por monócitos humanos. Na figura 12 podemos observar os resultados relativos à produção de TNF- α por monócitos após 18 horas de desafio com o fungo. O perfil de resposta foi bastante semelhante ao detectado no período de 4 horas. No entanto chama a atenção que os níveis de TNF- α induzidos pela cepa 265 foram significativamente maiores do que os detectados com a cepa 18. Além disso, a produção da citocina em resposta às duas cepas mostrou-se diminuída após o bloqueio de todos os receptores e os ensaios para detectar a participação individual de cada um deles mostrou um importante envolvimento de TLR2 e TLR4.

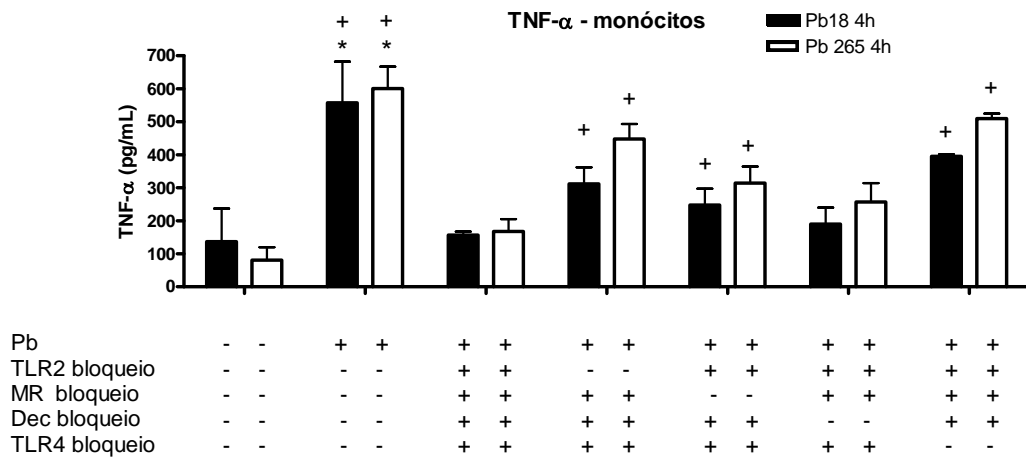


Figura 11. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de TNF- α por monócitos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, * $p < 0.05$ x bloqueio total.

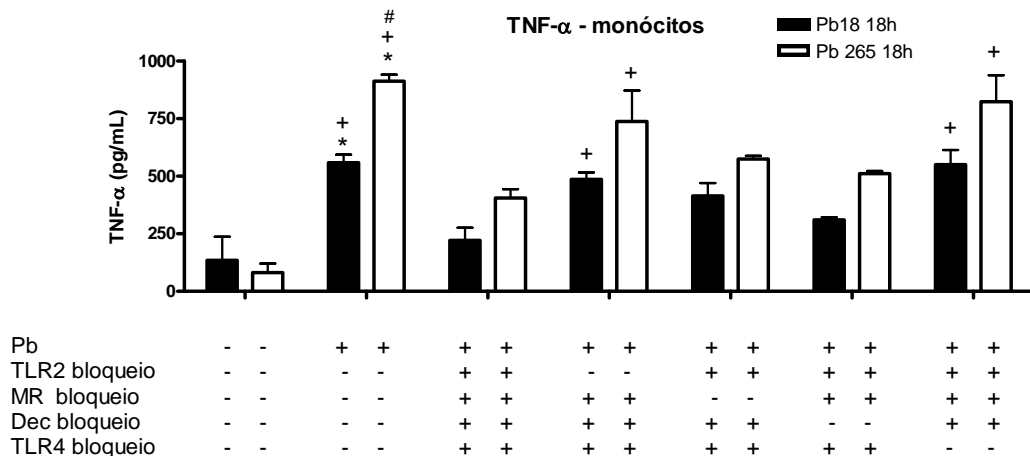


Figura 12. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de TNF- α por monócitos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, * $p < 0.05$ x bloqueio total, # $p < 0.05$ x Pb18.

6.4 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de IL-12 por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Nas figuras 13 e 14 podemos observar os resultados referentes ao efeito dos quatro receptores sobre a produção de IL-12 por monócitos humanos desafiados com as duas cepas do fungo, por 4 e 18 horas, respectivamente. Detectamos que as células controles produziram níveis bastante baixos de IL-12 que após o desafio com as cepas, aumentaram significativamente somente em resposta à cepa 265. A produção em resposta às duas cepas diminuiu significativamente nas culturas nas quais todos os receptores foram bloqueados, mostrando mais uma vez a participação de um ou mais dos receptores testados. Nos experimentos de avaliação individual, detectamos um envolvimento importante do MR e principalmente TLR4, na resposta para a cepa 265, pois somente nas culturas nas quais esses receptores foram disponibilizados é que detectamos níveis da citocina significativamente maiores dos detectados nos experimentos de bloqueio total. Não observamos envolvimento importante de nenhum dos receptores testados na resposta à cepa 18, com exceção do TLR4.

Após 18 horas de desafio com o fungo, (figura 14) os níveis da citocina aumentaram consideravelmente em relação ao período de 4 horas, particularmente em relação à cepa 265. Em relação à participação dos receptores detectamos uma redução significativa da produção da citocina, quando todos foram bloqueados. Quando analisados de forma individual, o TLR4 e MR continuaram apresentando maior envolvimento, em especial com cepa 265 e, de forma diferente ao detectado após 4 horas, a cepa 18 induziu maiores níveis de IL-12 com a participação de não só um, mas dos quatro receptores.

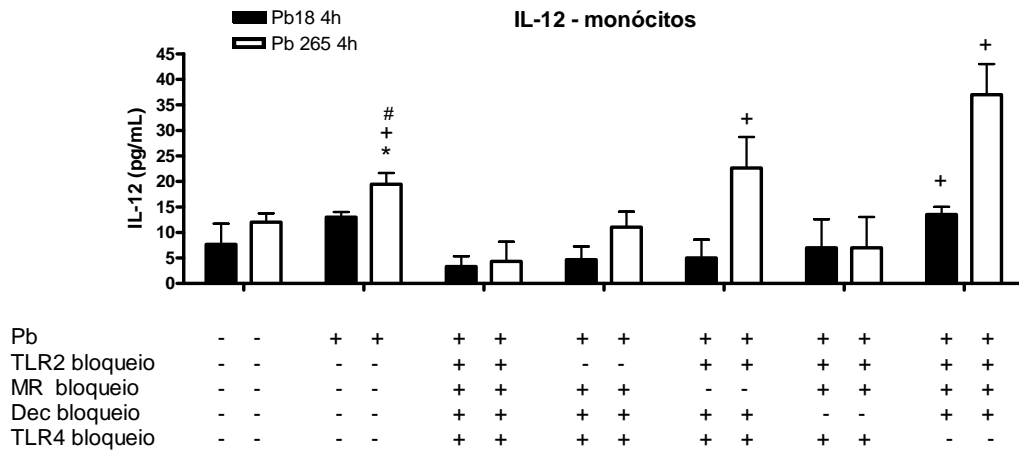


Figura 13. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-12 por monócitos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, $^+p < 0.05$ x bloqueio total, $^{\#}p < 0.05$ x Pb18.

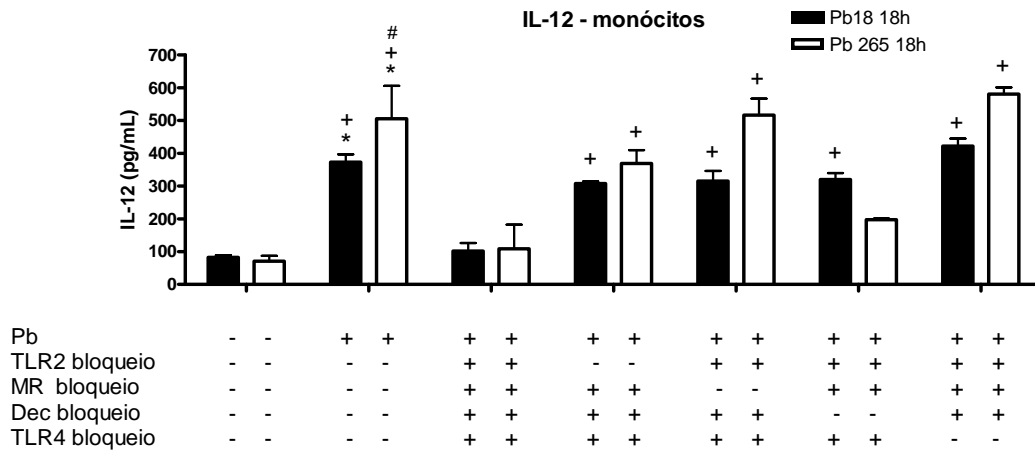


Figura 14. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-12 por monócitos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, $^+p < 0.05$ x bloqueio total, $^{\#}p < 0.05$ x Pb18.

6.5 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de IL-10 por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.

As figuras 15 e 16 mostram os resultados referentes à produção de IL-10 após 4 e 18 horas de incubação com o fungo. Podemos observar que o desafio das células com o fungo por 4 horas induz um aumento na produção da citocina que é maior com a cepa 18. Essa produção, no entanto, diminuiu significativamente nas células nas quais todos os três receptores foram bloqueados. Chama a atenção, no entanto que nos ensaios para avaliar a participação individual de cada um deles os resultados mostram envolvimento de diferentes receptores na dependência da cepa utilizada. Para a cepa 265, o receptor de maior envolvimento na produção de IL-10 foi o TLR2, já para a cepa 18 detectamos um envolvimento claro do TLR2, MR e TLR4. No período de 18 horas detectamos um envolvimento dos quatro receptores na resposta às duas cepas, com pequeno destaque para TLR2 com a cepa 18.

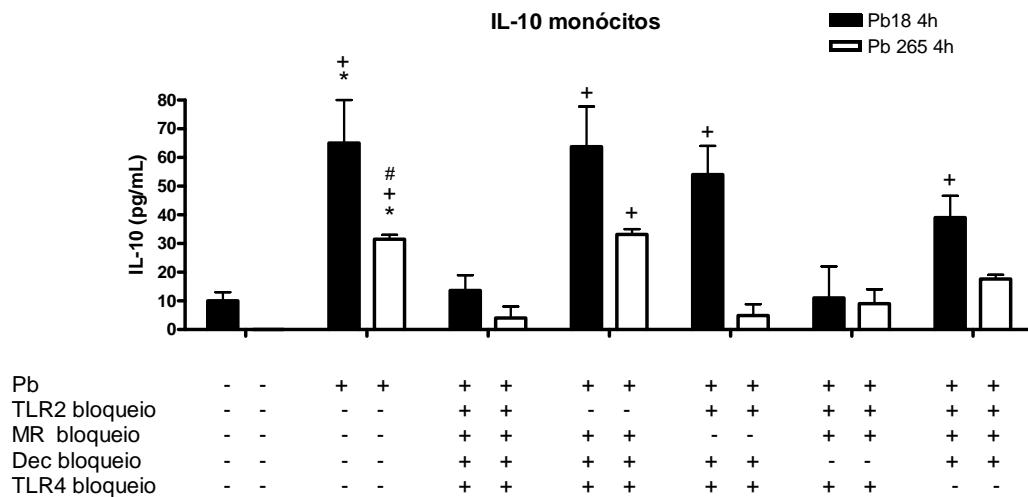


Figura 15. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-10 por monócitos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, + $p < 0.05$ x bloqueio total, # $p < 0.05$ x Pb18.

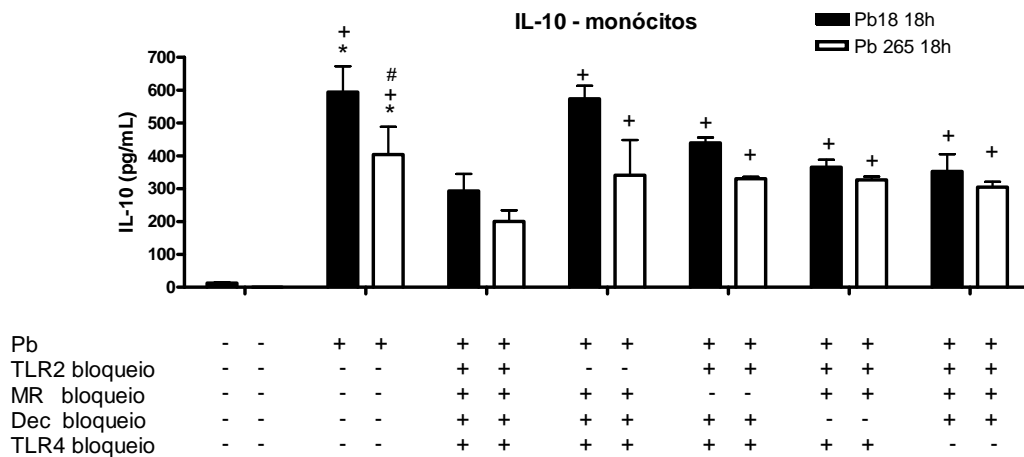


Figura 16. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-10 por monócitos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, + $p < 0.05$ x bloqueio total, # $p < 0.05$ x Pb18.

6.6 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de PGE₂ por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Nas figuras 17 e 18 podemos analisar os resultados relativos à produção de PGE₂ por monócitos em resposta às duas cepas de Pb. Detectamos que monócitos controles produzem quantidades substanciais de PGE₂ que, no entanto, aumentam significativamente após o desafio com Pb18 e 265 por um período de 4 horas (figura 17), não havendo diferenças importantes entre elas. Chama a atenção, no entanto, que esses níveis não se apresentam alterados nas culturas nas quais os quatro receptores foram bloqueados, mostrando o possível não envolvimento do TLR2, MR, dectina -1 e TLR4 na produção de PGE₂ por monócitos em resposta ao *P.brasileinsis*. Respostas semelhantes foram detectadas após o desafio com Pb18 ou 265 por 18 horas (figura 18).

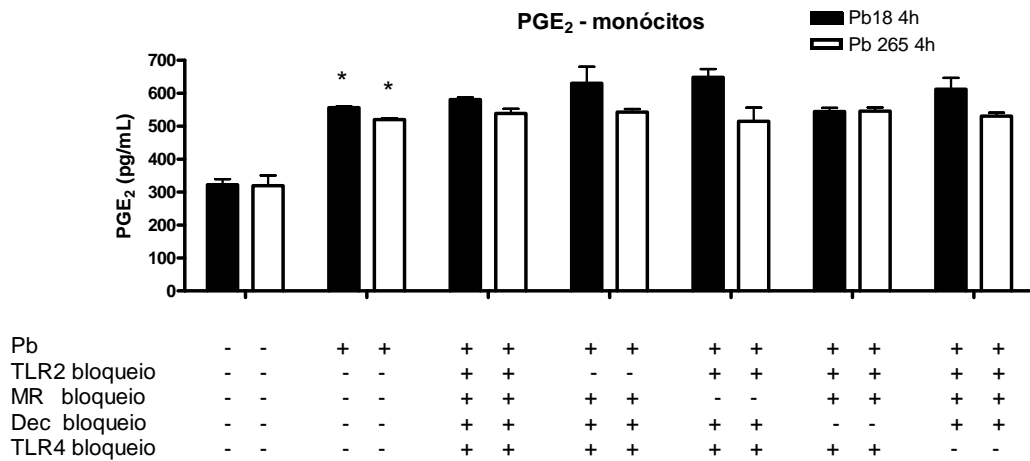


Figura 17. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de PGE₂ por monócitos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle.

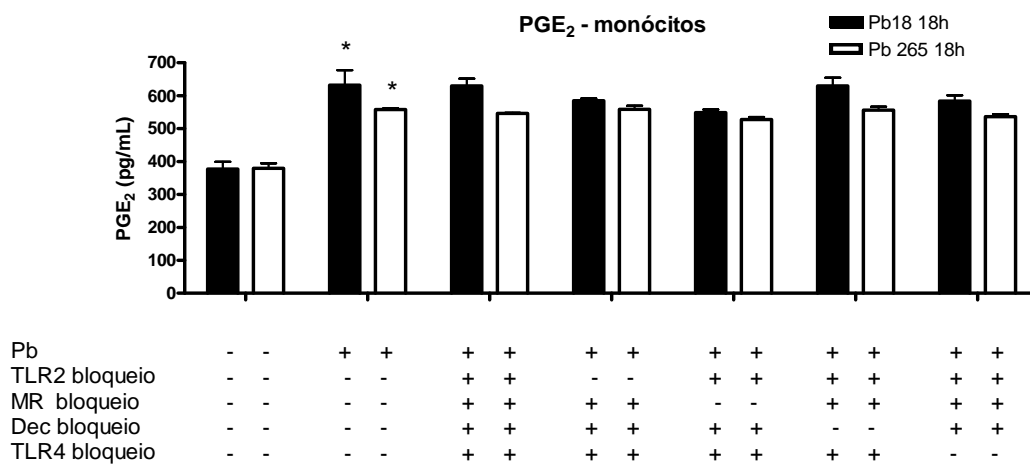


Figura 18. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de PGE₂ por monócitos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle.

6.7 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de por LTB₄ por monócitos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Os resultados relativos à produção de LTB₄ são mostrados nas figuras 19 para os ensaios de 4 horas e 20 para os de 18 horas. Detectamos que células controles já liberam concentrações significativas de LTB₄, que, no entanto aumentam de forma significativa após o desafio com as duas cepas do fungo por 4 horas, não havendo diferenças entre elas. Respostas semelhantes foram detectadas após o desafio de 18 horas. Da mesma forma que o detectado para PGE₂, o bloqueio dos quatro receptores não alterou a capacidade das células em liberarem o mediador, mostrando que a produção de LTB₄ por monócitos em resposta ao *P. brasiliensis*, não envolve reconhecimento do fungo por TLR2, MR, dectina-1 ou TLR4.

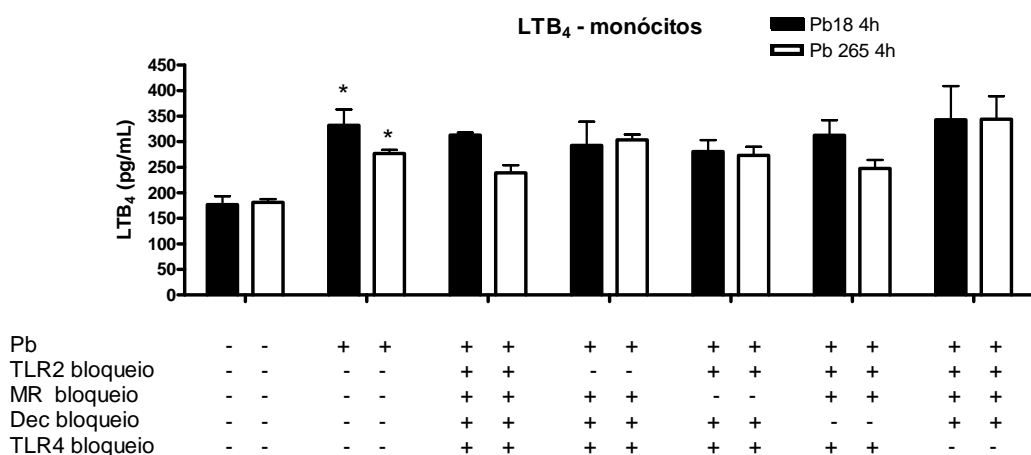


Figura 19. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de LTB₄ por monócitos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle.

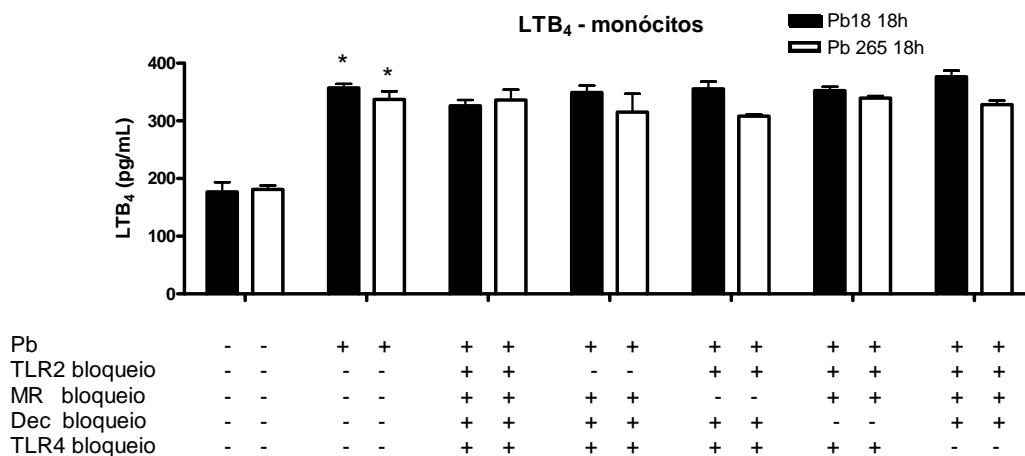


Figura 20. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de PGE₂ por monócitos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle.

6.8 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de citocinas por neutrófilos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Neutrófilos de apenas um indivíduo entre os testados produziram concentrações detectáveis de TNF- α , o que nos impede de realizar uma análise em relação à participação dos receptores na produção desta citocina. Assim, serão mostrados os resultados referentes à produção de IL-12 (figuras 21 e 22) e IL-10 (figuras 23 e 24). Em relação a IL-12, avaliada após 4h, não detectamos sua produção pelas células controles. No entanto, um aumento significativo dos níveis da citocina foi detectado quando as culturas foram desafiadas com o fungo, principalmente em resposta à cepa 265. A produção induzida pelas duas cepas foi significativamente inibida após o bloqueio total dos receptores. A avaliação individual de cada um deles mostrou que respostas significativamente diferentes das obtidas a partir do bloqueio total foram detectadas nos ensaios de disponibilidade dos receptores TLR2 e Dectina-1 e principalmente TLR4 na resposta a cepa 265, indicando a participação desses receptores. A cepa 18 estimulou uma produção basal da citocina, não sendo possível identificar o envolvimento de algum receptor. No período de 18h (figura 22) houve uma queda na produção desta citocina em todos os grupos estudados quando comparados ao período de 4h. O envolvimento de TLR2, dectina-1 e TLR4 permaneceu evidente mesmo no período de 18h e ao contrário do período inicial, a cepa 18 induziu, mesmo que em baixos níveis, a produção desta citocina nos grupos de bloqueios seletivos, destacando que o receptor de maior envolvimento foi o TLR4 seguido pelo TLR2.

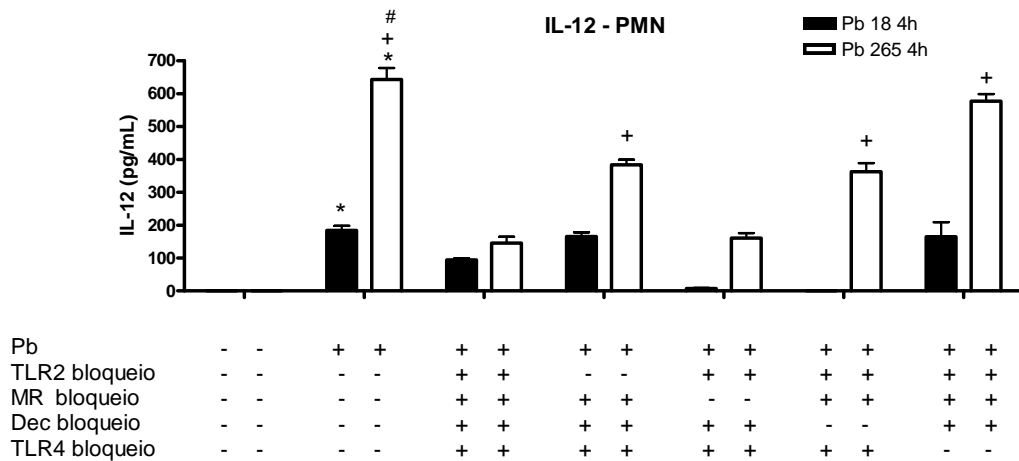


Figura 21. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-12 por neutrófilos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, + $p < 0.05$ x bloqueio total, # $p < 0.05$ x Pb18.

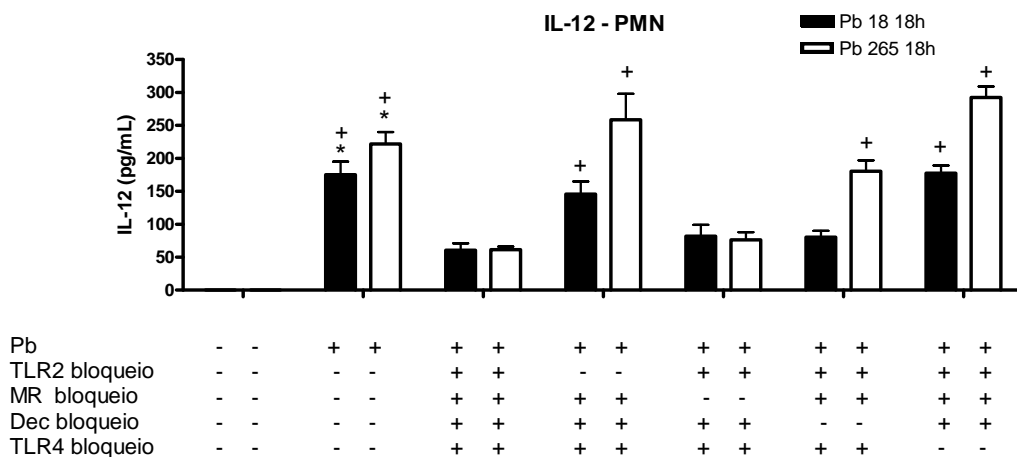


Figura 22. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-12 por neutrófilos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, + $p < 0.05$ x bloqueio total.

Os resultados referentes à produção de IL-10 após o desafio das células com o fungo por 4 horas (figura 23) mostraram que as duas cepas induziram níveis significativos de IL-10 com tendência a uma maior produção com a cepa 18. Esses níveis foram inibidos quando os quatro receptores foram bloqueados. Avaliando a participação individual de cada receptor, observamos o envolvimento de diferentes receptores na dependência da cepa utilizada. No caso da cepa 18, observamos a participação dos quatro receptores na produção da citocina com destaque para o MR, enquanto que na cepa 265 o receptor envolvido foi somente o TLR2. De forma geral, no período de 18h (figura 24) as análises seguiram o mesmo padrão, levando-se em conta que os picos de produção de IL-10 foram mais acentuados quando comparados ao período de 4h.

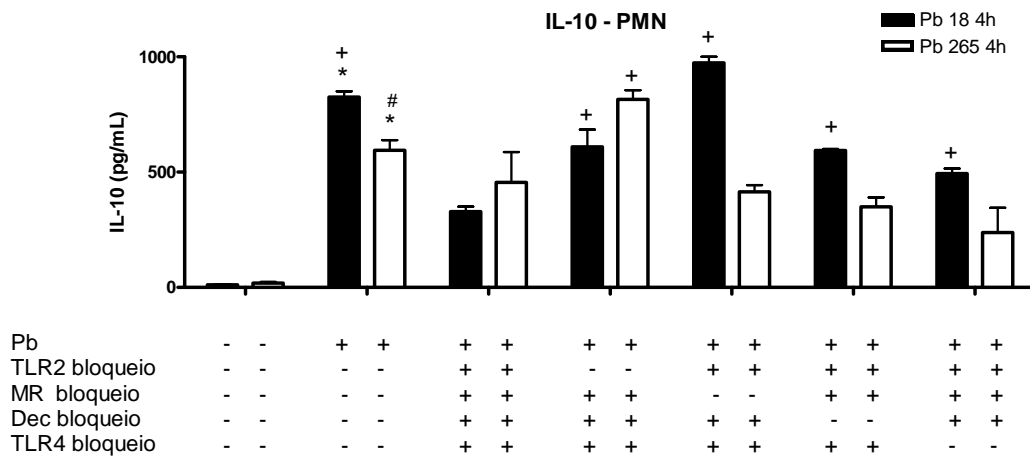


Figura 23. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-10 por neutrófilos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, + $p < 0.05$ x bloqueio total, # $p < 0.05$ x Pb18.

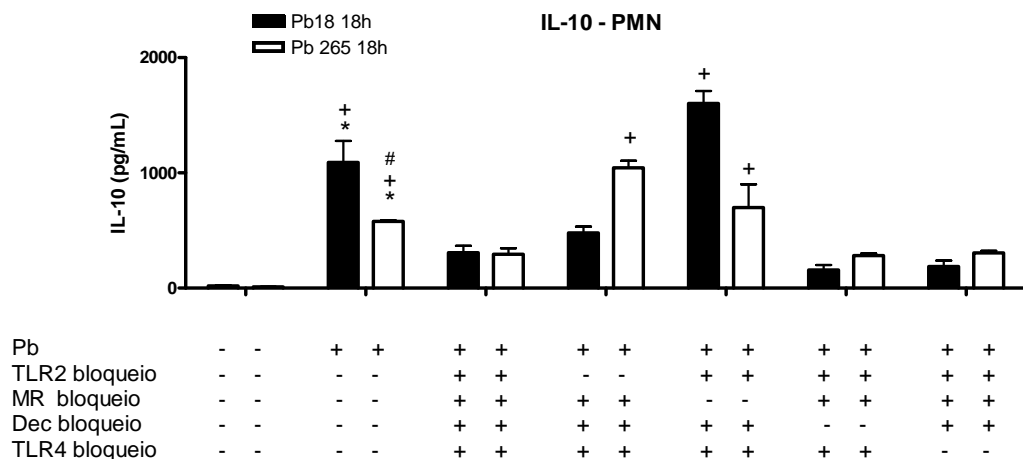


Figura 24. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de IL-10 por neutrófilos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média \pm EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. * $p < 0.05$ x controle, + $p < 0.05$ x bloqueio total, # $p < 0.05$ x Pb18.

6.9 Avaliação da expressão de IL-10 intracitoplasmática em neutrófilos por citometria de fluxo

Na figura 25 podemos analisar os dados que representam a expressão intracitoplasmática de IL-10 em neutrófilos, medida pela intensidade média de fluorescência e observada através do gráfico de barras (A) ou por histogramas representativos (B e C). Quando as culturas celulares foram desafiadas com as cepas de *P. brasiliensis* observamos um aumento na expressão desta citocina em especial com cepa 18, quando comparamos as culturas sem estímulo. No entanto, através dos bloqueios individuais dos receptores, não foi possível determinar a influência de cada um deles, visto que, os valores permaneceram equiparados ao grupo que só foi estimulado com fungo.

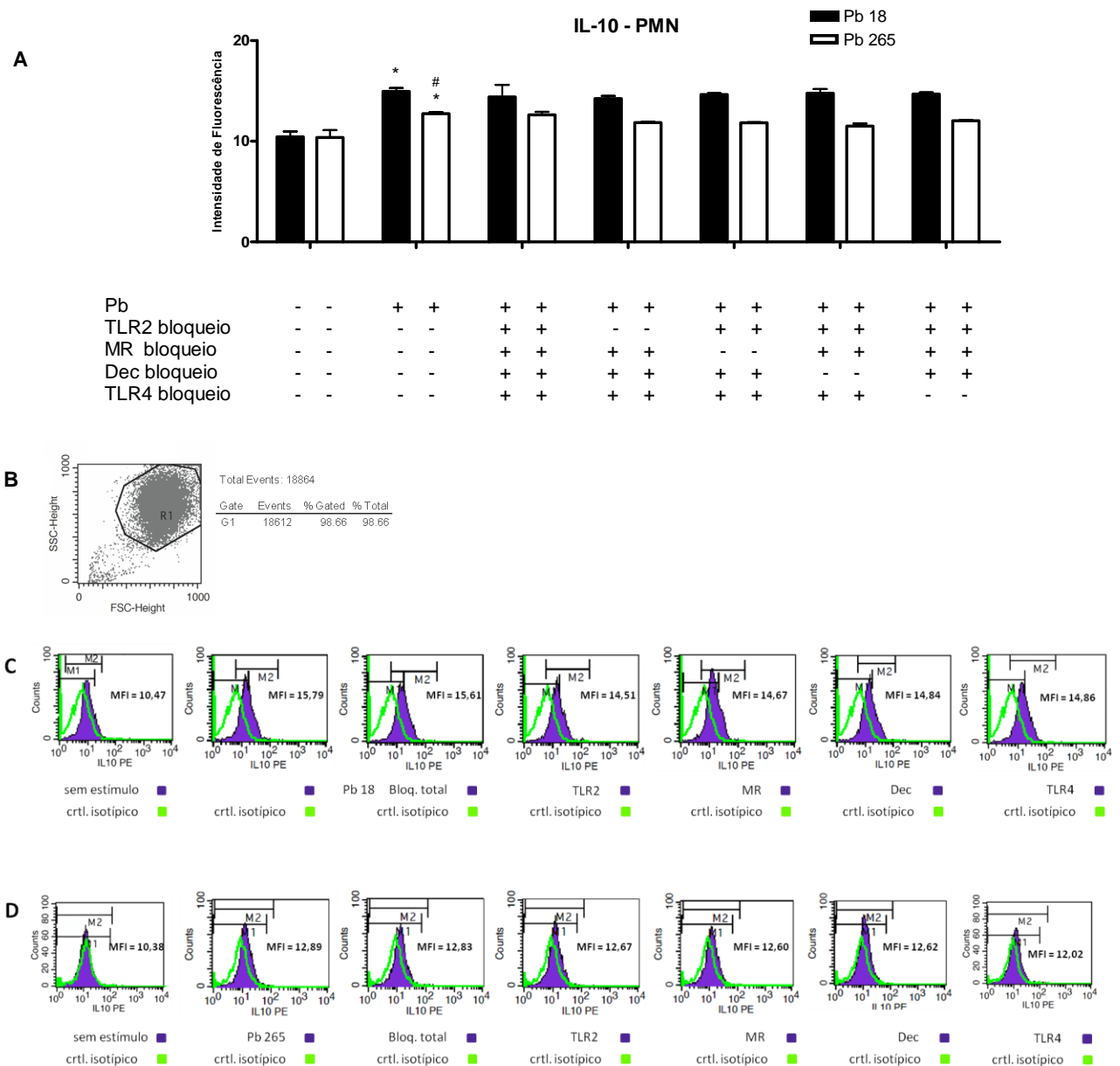


Figura 25. Análise da expressão intracitoplasmática de IL-10 em neutrófilos incubados na ausência ou presença de anticorpos monoclonais anti-TLR2, anti-MR, anti-dectina-1 ou anti-TLR4 de e desafiados por 18h com *P. brasiliensis* (Pb18 e/ou Pb265, proporção fungo/célula de 1:50).

(A) representa a intensidade de fluorescência média em neutrófilos avaliadas quanto à expressão intracitoplasmática de IL-10 por citometria de fluxo.

(B) representa gráfico de dot-plot no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (R1)

(C e D) histogramas representativos quanto à expressão de IL-10 intracitoplasmática por citometria de fluxo (os grupos de estímulo e bloqueio seguem o mesmo padrão visto em [A])

C: Pb18 e D: Pb265

* $p < 0,05$ x controle (sem bloqueio e sem PB); # $p < 0,05$ x Pb18

6.10 Efeito de TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 sobre a produção de PGE₂, por neutrófilos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Nas figuras 25 e 26 podemos analisar os resultados relativos à produção de PGE₂ (4 e 18 horas, respectivamente) Detectamos no primeiro período que células controles produzem baixas quantidades de PGE₂, que no entanto, aumentam consideravelmente após o desafio com as duas cepas do fungo, em especial com a cepa 18. Após o bloqueio dos três receptores essa produção diminuiu significativamente indicando a participação dos receptores. A avaliação individual mostrou que o dectina-1 e o MR se apresentam mais envolvidos na produção deste mediador, tanto na presença da cepa 18 quanto da 265. No período de 18 horas, chama a atenção que o bloqueio total dos receptores não induziu uma diminuição tão significativa na produção de PGE₂ como detectado no período de 4 horas. Além disso, os resultados de participação individual indicam o envolvimento de TLR2, MR e dectina-1 na resposta induzida pela cepa 18, enquanto que para a cepa 265, os resultados não foram significativos para nenhum dos receptores testados.

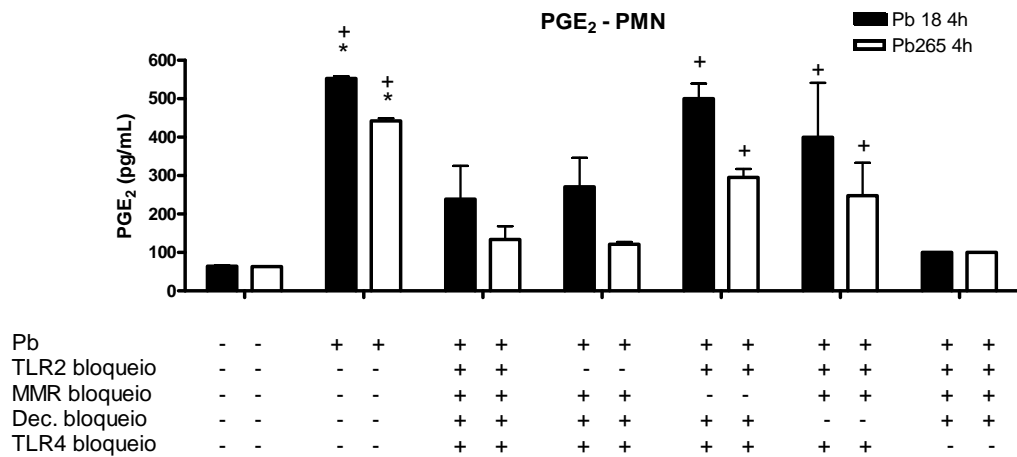


Figura 26. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de PGE₂ por neutrófilos humanos desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média ± EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. *p < 0.05 x controle, †p < 0.05 x bloqueio total.

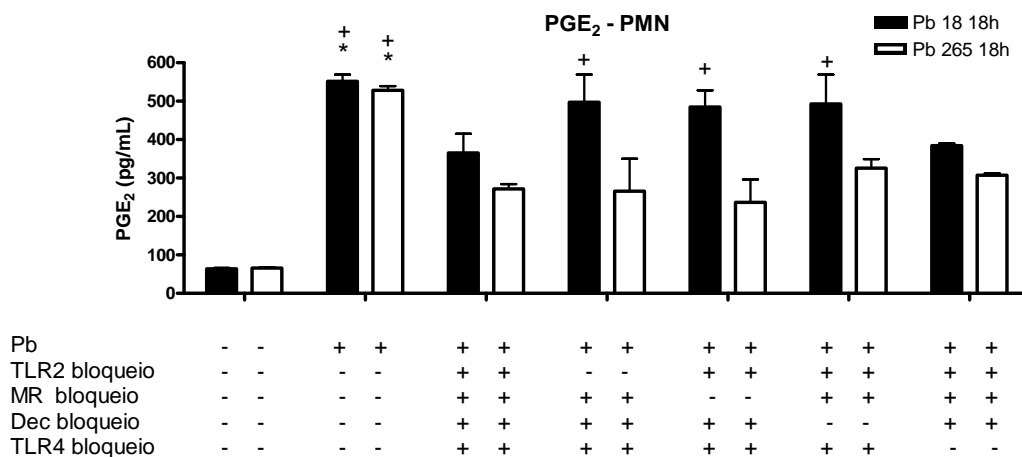


Figura 27. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de PGE₂ por neutrófilos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média ± EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. *p < 0.05 x controle, †p < 0.05 x bloqueio total.

6.11 Efeito de TLR2, MR e dectina-1 sobre a produção de LTB₄ por neutrófilos desafiados com Pb18 ou Pb265.

Os resultados relativos à produção de LTB₄ são mostrados nas figuras 28 e 29, para os ensaios de 4 e 18 horas respectivamente. Detectamos que células controles já liberam concentrações consideráveis de LTB₄ que, no entanto, aumentam de forma significativa após o desafio com as duas cepas do fungo por 4 e 18 horas, não havendo diferenças entre elas. O bloqueio dos três receptores não alterou a capacidade das células liberarem o mediador, mostrando que a produção de LTB₄ por neutrófilos independe dos receptores estudados.

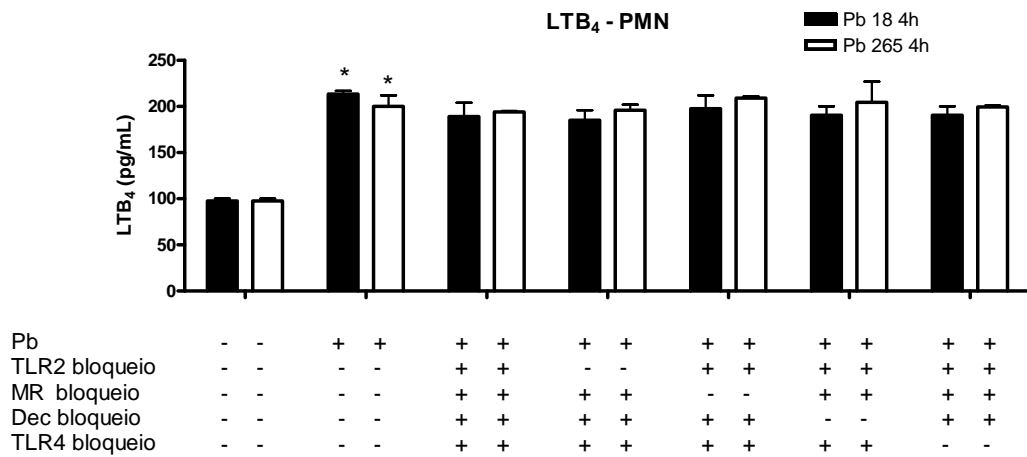


Figura 28. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de LTB₄ por neutrófilos humanos desafiados por 4 h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média ± EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. *p < 0.05 x controle.

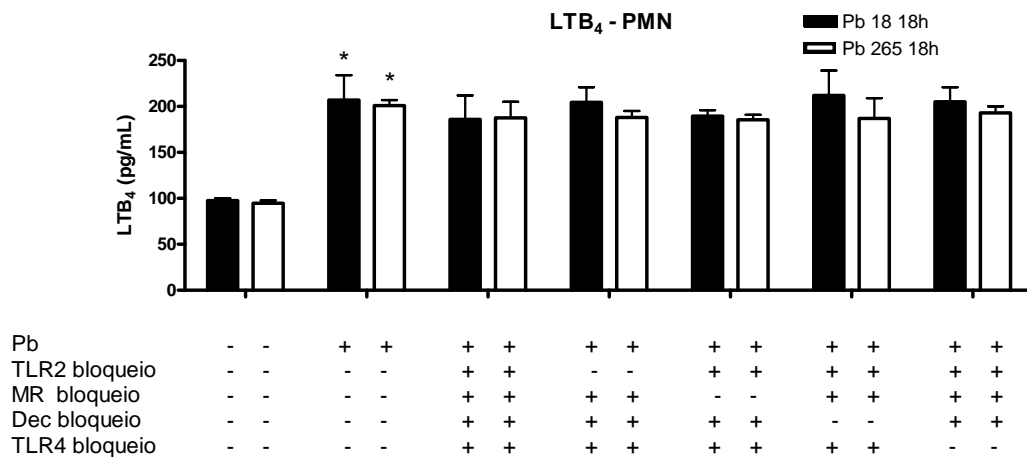
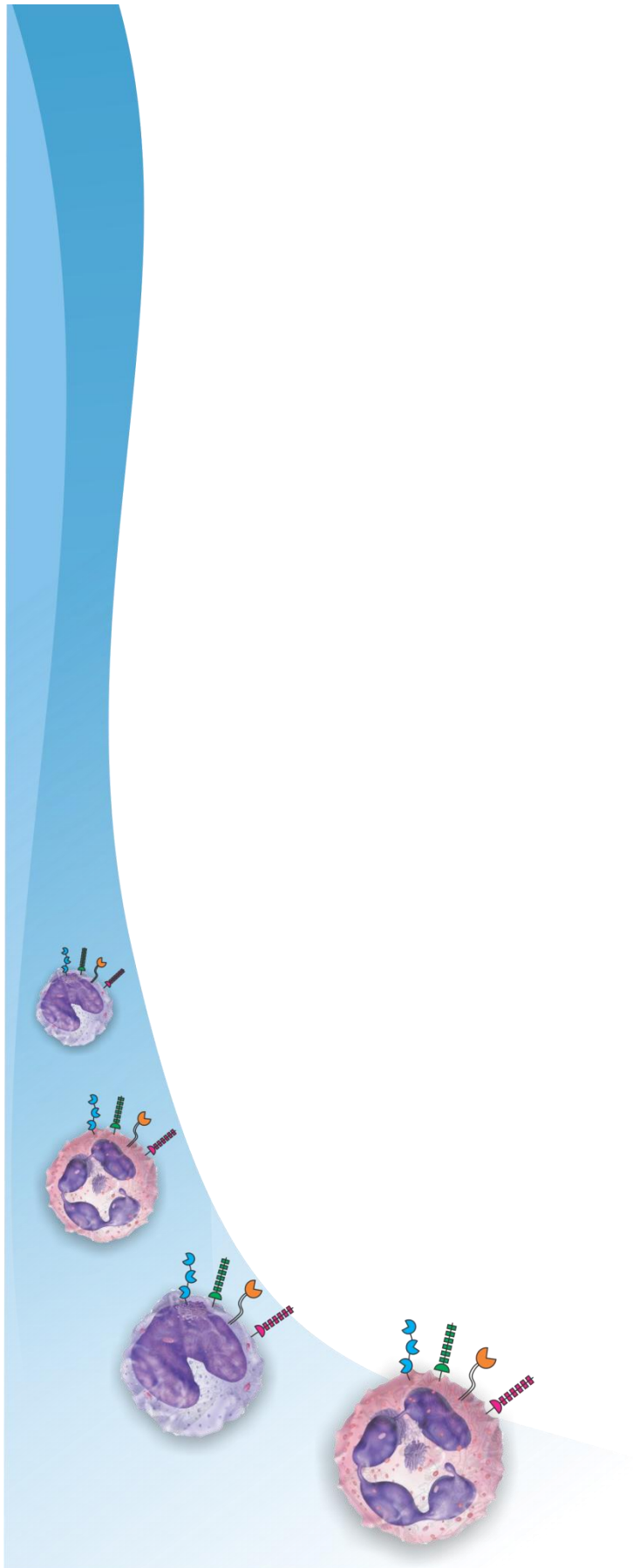


Figura 29. Envolvimento dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de LTB₄ por neutrófilos humanos desafiados por 18h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção fungo/célula de 1:50). Os resultados representam a média ± EPM de ensaios realizados com sangue periférico de 10 indivíduos. *p < 0.05 x controle.



Discussão

7. Discussão

O sistema imunológico dos vertebrados superiores é formado por dois componentes principais, a resposta inata e a adaptativa, que são ativadas em conjunto com o objetivo de destruir agentes patogênicos intra e extracelulares. Um número crescente de pesquisas nos últimos anos tem se voltado para um melhor entendimento do desenvolvimento da resposta imune inata, particularmente no que se refere ao reconhecimento de patógenos, incluindo os fungos, pelas principais células envolvidas nessa resposta, os macrófagos, monócitos e neutrófilos, via os receptores de reconhecimento de estruturas moleculares padrões (PRRS). Os estudos têm claramente mostrado que os mecanismos envolvidos nesse reconhecimento direcionarão o destino da relação fagócitos/microrganismos, no sentido de determinar se esses serão destruídos por essas células ou escaparão dos seus mecanismos efetores, se a resposta a ser modulada por essas células terá um padrão pró e ou antiinflamatório e ainda como essa resposta irá instruir a resposta imune adaptativa. Assim, o melhor conhecimento desse processo para os diferentes microrganismos permitirá que futuras estratégias de modulação dessas células possam ser adotadas em favor do hospedeiro infectado (Tarakhovsky & Kroemer, 2012).

Na relação das células fagocitárias com o fungo *P. brasiliensis* esse conhecimento é ainda bastante escasso, particularmente no que se refere aos mecanismos de modulação exercidos por essas células através da liberação de citocinas e eicosanóides. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a participação dos receptores TLR2, MR, dectina-1 e TLR4 na produção de citocinas pró e antiinflamatórias e dos eicosanóides PGE₂ e LTB₄ por monócitos e neutrófilos humanos em resposta a cepas de *P. brasiliensis* de alta e baixa virulência. Escolhemos esses receptores em função de estarem entre os principais envolvidos no reconhecimento fúngico (Romani, 2004).

Iniciamos nossos experimentos, avaliando a expressão constitutiva desses receptores, independente de estimulação, de modo a confirmar sua presença na superfície dos dois tipos celulares. Estudos têm mostrado que neutrófilos e monócitos apresentam uma expressão diferencial desses receptores (Netea *et al.* 2008). Constatamos que os quatro receptores são expressos nos dois tipos

celulares e que a porcentagem de células que os expressa varia em função do tempo de incubação. Assim, escolhemos o período no qual um maior número de células expressava os três receptores. Apesar da expressão dos vários receptores serem modulados em resposta a diferentes estímulos, nos nossos ensaios, a não estimulação foi proposital de forma a mimetizar a infecção natural, na qual durante as primeiras fases da infecção, a interação da célula fúngica com a célula fagocitária ocorre sem a presença de estimulação prévia. A escolha das citocinas baseou-se no fato de que o TNF- α e IL-12 são consideradas pró-inflamatórias e a IL-10 antiinflamatória.

Detectamos que as leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de induzir a produção de TNF- α por monócitos, e que a cepa de baixa virulência (Pb265) estimulou maior produção quando comparada a de maior virulência (Pb18). Esses resultados confirmam dados anteriores em relação a diferenças na indução dessa citocina por cepas consideradas como de alta ou baixa virulência. Nesse sentido, Calvi *et al* (2003), estudando pacientes com PCM, verificaram que a produção de TNF- α por monócitos infectados, *in vitro*, com a cepa de menor virulência, induzia níveis mais elevados de TNF- α em comparação à cepa virulenta. Além disso, níveis mais elevados dessa citocina apresentaram correlação com a maior atividade fungicida dos monócitos, demonstrando a importância do TNF- α para a ativação das células fagocitárias e consequente maior destruição fúngica. Da mesma forma, a incubação de monócitos humanos com IFN- γ e com frações da parede do *P. brasiliensis* rica em β -glucana, induziu essas células a uma maior produção de TNF- α com consequente aquisição de maior atividade fungicida (Anjos *et al.* 2002). Ainda, monócitos incubados diretamente com concentrações ideais de TNF- α , apresentam alta atividade fungicida mesmo em resposta a cepa de alta virulência (Carmo *et al.*, 2006).

Assim, fica claro que os níveis dessa citocina podem variar na dependência da virulência ou da composição da parede celular da cepa com a qual o indivíduo entra em contato, e consequentemente interferir nos padrões de resistência do hospedeiro.

Avaliando individualmente o papel dos receptores na produção do TNF- α por monócitos, constatamos que o receptor de maior envolvimento foi o TLR2 e o

TLR4. Comparando este resultado com os detectados para outras infecções fúngicas percebemos um envolvimento constante de TLR2 e TLR4 na produção de TNF- α pelas células fagocitárias. Bellocchio *et al.* (2004), em trabalho experimental, detectou que tanto o TLR2 como o TLR4 têm diferentes papéis na ativação da resposta imune inata contra *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, sendo que ambos podem ativar o NF- κ B e induzir a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias por macrófagos e células dendríticas, evidenciando uma participação efetiva na resposta imune inata e no direcionamento da resposta adaptativa. Outros estudos realizados com macrófagos peritoneais murinos demonstraram que esférulas de *Coccidioides posadasii* estimulam a produção de TNF- α , via interação com TLR2, MyD88 e Dectin-1 (Viriyakosol *et al* 2005).

Além do TNF- α , outra citocina de padrão proinflamatório testada foi a IL-12, que é a principal citocina envolvida na instrução da resposta imune adaptativa para um padrão de resposta do tipo Th1, considerada como altamente protetora nas infecções por microrganismos intracelulares, como a PCM, por liberar citocinas indutoras de inflamação e ativadoras da função macrófaga.

Detectamos que monócitos produzem essa citocina em resposta às duas cepas do fungo, mas que uma maior resposta foi detectada para a cepa menos virulenta. Adicionalmente, nossos resultados deixaram claro a participação do MR e TLR4 na produção dessa citocina. Em relação ao MR, esses resultados são semelhantes aos detectados recentemente por Aldo *et al.* (2012). Esses autores demonstraram que a expressão de genes para MR foi significativamente induzida após reconhecimento do *P. brasiliensis* por células dendríticas. Este aumento na expressão de genes para MR esteve relacionado com o aumento da produção de IL-12 por estas células. No que se refere aos receptores do tipo Toll, Calich *et al.* (2008) demonstrou que macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 e TLR2 infectados pelo *P. brasiliensis* possuem baixa atividade fagocítica, e secretam baixas concentrações desta citocina, além de NO, e MCP-1, ainda que essas alterações não reflitam em maiores índices de mortalidade.

Como citado antes, além de citocinas de padrão pró-inflamatório tivemos interesse na avaliação de citocinas antiinflamatórias, cujo protótipo é a IL-10. Nossos resultados mostraram que as duas cepas induzem a produção dessa

citocina por monócitos, com destaque para a cepa virulenta. Sabe-se que as citocinas antiinflamatórias como a IL-4 e a IL-10 desempenham atividade desativadora de células do sistema imune e a sua produção desbalanceada leva a infecções graves, principalmente aquelas produzidas por patógenos intracelulares. Vários estudos associam a IL-10 a uma resposta deficiente ao *P. brasiliensis*. Altas concentrações de IL-10 são detectadas no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM, quando estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis*, enquanto que em culturas de células de pacientes tratados os níveis são bem menores (Diniz *et al.*, 2001). Além disso, a concentração do RNAm para IL-10 produzido por células de pacientes com a FJ é maior em relação aos pacientes com a FA e indivíduos com PI, mostrando a sua associação com as formas mais graves da doença (Mamoni e Blotta, 2005). Neworal *et al.* (2003) observaram um aumento de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β , em linfonodos de pacientes com a forma juvenil da PCM, sugerindo que a estimulação da produção destes fatores pode representar um mecanismo de escape para o fungo, tornando os macrófagos refratários aos efeitos estimuladores do IFN- γ e contribuindo para a evolução da doença. A partir de nossos resultados podemos inferir que a cepa 18 por induzir maior produção de IL-10 pode escapar mais eficientemente das funções efectoras dos monócitos.

Avaliando individualmente a participação dos receptores na produção desta citocina, nos chamou a atenção que, na dependência da cepa utilizada, diferentes receptores exercem maior ou menor influência. Para a cepa 265, o receptor de maior envolvimento foi o TLR2, já para a cepa 18 detectamos um envolvimento claro do TLR2 e do MR e em menor grau TLR4 (4h). No período de 18 horas detectamos um envolvimento dos quatro receptores na resposta às duas cepas, com pequeno destaque para TLR2 com a cepa 18. Esses dados nos sugerem que as diferenças nos componentes da parede celular do fungo poderiam ser responsáveis pela ligação a diferentes receptores celulares e por consequência, estimularem diferentes padrões de resposta. Baseados nessa ideia, San-Blas (1993) realizou estudo, no qual foi determinado que o dimorfismo do *P. brasiliensis* pode ser controlado pela síntese dos polissacarídeos, como as glucanas. O autor demonstrou que cepas mais virulentas do *P. brasiliensis*

apresentam menor quantidade de β -glucana na composição de suas paredes, ao contrário das cepas com baixa virulência que apresentam grande quantidade desse carboidrato e induzem a uma resposta inflamatória bastante intensa (Silva *et al.*, 1994). Estas informações nos indicam que a composição da parede celular do *P. brasiliensis* pode estar relacionada com a modulação da resposta imune do hospedeiro, uma vez que estes componentes, em proporções variáveis, podem interagir com diferentes receptores da resposta imune inata.

A associação entre a expressão de TLR2 e produção de IL-10 tem sido estudada em outras infecções por fungos patogênicos, tais como *A. fumigatus* e *C. albicans* (Netea *et al.*, 2003,2004). O efeito deletério da sinalização via TLR2 durante a infecção por *C. albicans* está associada com o aumento da produção de IL-10 e o desenvolvimento de células T regulatórias ($CD4^+ CD25^+$), resultando em uma resposta imune celular deficiente e menor capacidade de eliminação do fungo (Netea *et al.*, 2004). A mesma associação foi observada em outros modelos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* (Van der Kleij *et al.*, 2002) e *Borrelia burgdorferi* (Diterich *et al.*, 2003), sugerindo um importante papel de TLR2 em induzir a expansão e as funções das células T reguladoras. Em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, células dendríticas pulmonares mostraram um aumento do gene de expressão para TLR2, associado a uma maior produção de IL-10, fato que contribuiu para uma maior suscetibilidade a infecção (Ferreira *et al.*, 2007). No caso da cepa 18 a produção de IL-10 também se mostrou associada ao MR uma vez que nos experimentos onde não houve seu bloqueio sua produção foi observada. Esse receptor tem sido descrito como mediador da fagocitose e morte de microrganismos patogênicos (Linehan, 2000), mas seu papel nas infecções fúngicas não tem sido totalmente esclarecido. Na PCM, estudos mostraram que os receptores CR3 e MR aumentam após o desafio de macrófagos murinos com os conídios de *P. brasiliensis* (Jimenez *et al.*, 2006). Além disso, foi mostrado que a fração gp43, o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, se liga ao MR para inibir a capacidade fagocítica e fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e susceptíveis (Popi *et al.*, 2002). Esta descoberta levou os autores a postular que a secreção de gp43 é um dos mecanismos de escape apresentados pelo *P. brasiliensis* e que essa proteína exerce seus efeitos ligando-se ao MR. Trabalho recente em nosso laboratório

mostrou que a IL-18 induz um aumento do crescimento *do P. brasiliensis* em monócitos humanos. Esse efeito foi atribuído ao fato da IL-18 aumentar a expressão de MR. Após a ligação do fungo a esses receptores, seriam emitidos sinais de desativação importantes, que de uma forma direta ou indireta estimulariam o crescimento do fungo (Dias- Melicio *et al.*, 2011). Baseado nos trabalhos supracitados e nos resultados obtidos em nosso estudo é possível afirmar que o MR está envolvido nos mecanismos de patogenicidade desenvolvidos durante a infecção pelo fungo.

Analisando de forma global os nossos resultados sobre os PRRs envolvidos na produção das citocinas fica claro que o mesmo PRR pode participar tanto da produção de citocinas pró como antiinflamatórias e assim participar tanto de mecanismos de proteção como dos de suscetibilidade à infecção. O TLR2 e TLR4 estão envolvidos na produção de TNF- α , assim como de IL-10 e o MR no de IL-12 e também de IL-10. Em relação ao TLR2 alguns estudos na literatura reforçam esses resultados. O TLR-2 é um dos PRRs com maior variedade de ligantes descritos, reconhecendo PAMPs de diferentes tipos de patógenos. Tal versatilidade de reconhecimento é devida, em grande parte, à sua capacidade de agir em conjunto com outras moléculas de TLRs como o TLR1 e TLR6 (Akira e Takeda, 2004). Dessa forma o TLR2 pode dar origem a diferentes tipos de resposta por parte das células que expressam essa molécula, originando tanto uma resposta pró-inflamatória (com produção de TNF- α e IL-12p70), como respostas antiinflamatórias, principalmente pela indução da produção de IL-10, e que podem ser utilizadas por alguns patógenos como possível mecanismo de escape (Netea *et al.*, 2006; Pathak *et al.*, 2007).

Em função dos estudos citados acima, podemos considerar que a ligação do fungo a um mesmo PRR pode desencadear tanto respostas de ativação como desativação das células fagocitárias, assim como uma modulação positiva ou negativa da resposta inflamatória resultante. Acreditamos que na dependência da cepa que está entrando em contato com esse receptor envolvendo concentrações diferentes dos PAMPs, pode ocorrer favorecimento na produção de uma ou outra citocina resultando em um ou outro processo de modulação.

Outra explicação acerca da capacidade de um mesmo receptor desencadear a produção diferenciada de citocinas pode ser dada pelo

polimorfismo de seus genes. Ogus *et al.*, 2004 constatou que o polimorfismo ocorrido em um único nucleotídeo no gene (Arg753Gln) do TLR-2 foi associado à produção diferencial de citocinas e à suscetibilidade à tuberculose relacionada à diminuição da capacidade de macrófagos de produzirem citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12). Outro polimorfismo do gene do TLR2 (Arg677Trp) descrito em trabalhos realizados na Coréia foi associado à forma mais grave da hanseníase (forma lepromatosa) e relacionado à produção aumentada de IL-10 e diminuída de IL-12 (Kang e Chae, 2001; Kang *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004).

Além da produção de citocinas tivemos interesse em avaliar o papel dos diferentes PRRs na produção de PGE₂ e LTB₄ por monócitos em resposta ao *P. brasiliensis*. A produção desses eicosanóides pelos monócitos particularmente PGE₂, tem sido detectada em vários estudos do nosso laboratório. Esses mediadores atuando de uma forma autócrina podem regular de uma forma diferencial a atividade dessas células contra o fungo (Soares *et al.*, 2001, Bordon-Graciani *et al.* 2012, Ferrari *et al.* 2010) Enquanto a PGE₂ inibe a atividade fungicida dessas células, reduzindo a produção de TNF- α e H₂O₂, o LTB₄ aumenta todas essas funções. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a capacidade dessas células liberarem tanto PGE₂, como LTB₄. No entanto, inesperadamente, nenhum dos PRRs mostrou-se envolvido na produção dos mediadores. Esses resultados não são esperados, pois alguns estudos mostram que a produção de eicosanóides por essas células em resposta a alguns PAMPS contendo resíduos de açúcar envolve MR e dectina-1 (Alvarez *et al.*, 2010). Assim, esperava-se que o *P. brasiliensis* que contém esses resíduos na sua parede estimulasse a produção dos mediadores via esses receptores. Experimentos adicionais devem ser realizados em uma tentativa de melhor esclarecer esses achados.

Além dos monócitos, tivemos interesse em avaliar a participação dos quatro receptores na liberação de citocinas e eicosanóides por neutrófilos em resposta ao fungo. Estudos em neutrófilos se tornam importantes à medida que essas células durante muito tempo foram vistas como efetoras finais dentro de uma resposta inflamatória aguda com um papel primário de destruir patógenos extracelulares. No entanto, nos últimos anos estudos mostrando a capacidade dessas células produzirem uma série de moléculas efetoras como as citocinas e

outras, têm mostrado um papel mais dinâmico e modulador dessas células sobre a resposta imune inata e adaptativa (Mantovani *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostram que os neutrófilos não produziram concentrações detectáveis de TNF- α em resposta ao fungo. Essas respostas são esperadas uma vez que os estudos mostram que essas células não produzem TNF- α em resposta a vários estímulos. Alguns estudos mostram que a produção de TNF- α por neutrófilos pode resultar de uma contaminação das culturas por monócitos, que efetivamente estariam produzindo essa citocina (Cassatella, 1999). Apesar de não termos realizado uma purificação de nossas culturas, o nosso método de isolamento tem se mostrado bastante efetivo na separação de uma população bastante rica de neutrófilos com presença de uma concentração bastante pequena de células mononucleares, o que justifica a não detecção de TNF- α .

Ao contrário, do TNF- α , detectamos que os neutrófilos liberaram concentrações significativas de IL-12, particularmente em resposta a Pb265. Esses resultados são esperados, pois a produção de IL-12 por neutrófilos tem sido confirmada por trabalhos mais recentes (Mantovani *et al.*, 2011) A capacidade de os neutrófilos produzirem IL-12 em resposta ao fungo, é um dado bastante interessante no sentido de que essas células podem ser adicionadas aos monócitos como células da resposta imune inata que desempenham um papel importante na instrução da resposta imune adaptativa para um padrão Th1 e que a cepa menos virulenta é mais efetiva nesse processo. Os resultados mostraram que essa produção é mediada pela ligação do fungo ao TLR2, dectina-1 e principalmente TLR4. Esses resultados mostram que na dependência da população celular, diferentes receptores podem participar da produção de uma mesma citocina, uma vez que no caso dos monócitos o receptor mais envolvido na produção de IL-12 foi o MR e TLR4.

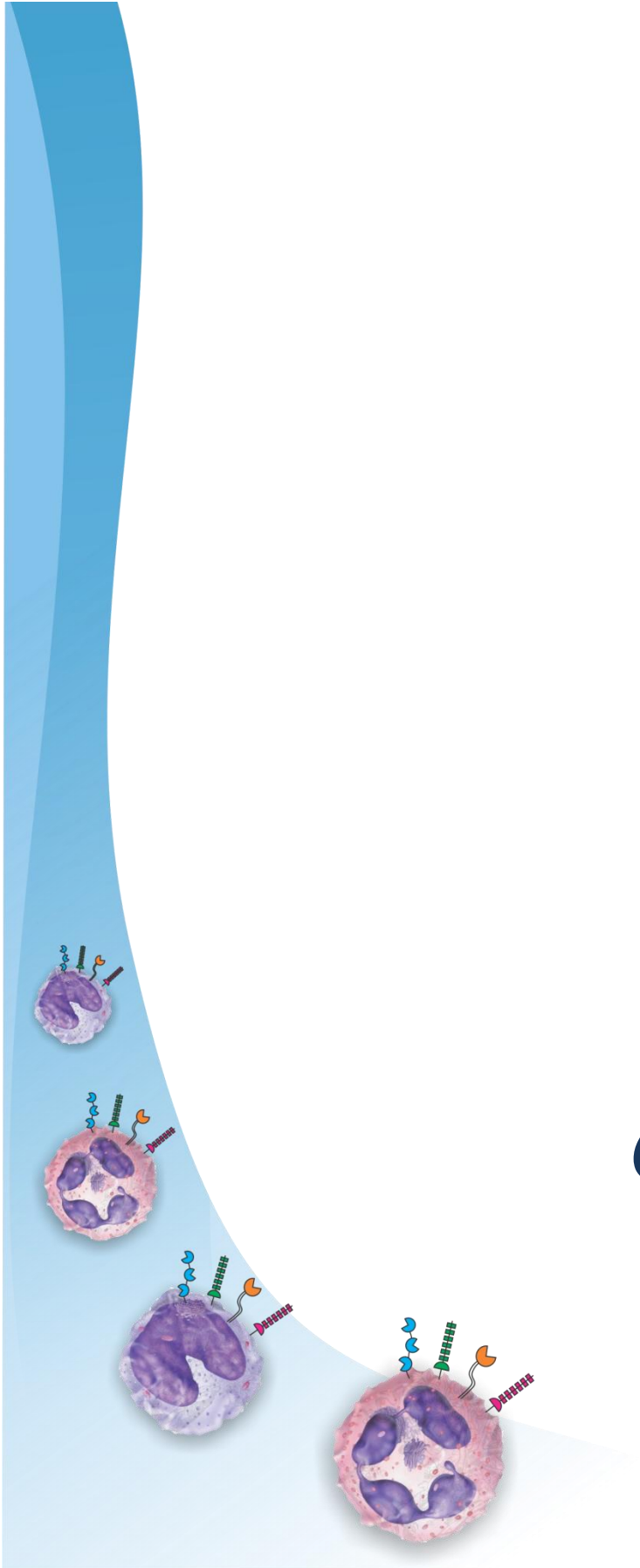
Detectamos também, que os neutrófilos em resposta ao fungo produzem IL-10, principalmente em resposta à cepa mais virulenta. A produção de IL-10 por neutrófilos também tem sido tema de discussão na literatura, justamente pela possibilidade de contaminação por monócitos (Mantovani *et al.*, 2011; Davey *et al.*, 2011; De Santo *et al.*, 2010). Nesse sentido a verificação da produção de IL-10 não foi somente avaliada em sobrenadantes de cultura, mas também

intracitoplasmaticamente por citometria de fluxo e os resultados confirmam a presença de IL-10 nesse tipo celular. Este ensaio permite que seja separado para análise somente o “gate” referente aos neutrófilos. Além disso, para esta avaliação fizemos uma purificação da população de neutrófilos através da separação das células por “beads” acopladas a anticorpo monoclonal anti CD16. Dessa forma, eliminamos ao máximo a chance de a IL-10 ser produzida por outros tipos celulares que não sejam neutrófilos. Os resultados confirmaram a produção de IL-10 por esse tipo celular

A produção de IL-10 por neutrófilos implica que essa célula pode também participar dos mecanismos de desativação das células que respondem ao fungo, incluindo macrófagos, monócitos e os próprios neutrófilos. Os receptores envolvidos na produção foram o MR e o TLR2 com destaque para o MR, na resposta induzida pela cepa 18, enquanto que na cepa 265 o receptor envolvido foi o TLR2. De forma semelhante ao discutido para os monócitos, os resultados deixam claro que o fungo ligando-se a um mesmo receptor pode induzir respostas tanto pró como antiinflamatórias e ativadoras ou desativadoras das funções celulares.

O presente estudo também mostrou a capacidade de os neutrófilos produzirem PGE_2 e LTB_4 em resposta ao fungo. Apesar de a literatura ter mostrado a capacidade dos neutrófilos responderem aos vários estímulos liberando eicosanóides, principalmente PGE_2 (Alvarez *et al.*, 2010), este é o primeiro estudo mostrando a produção de eicosanóides por essas células em resposta ao *P. brasiliensis*. Adicionalmente conseguimos detectar que a produção de PGE_2 , por essas células foi mediada pelo MR e o dectina-1, receptores indicados na literatura como os mais importantes no reconhecimento de PAMPS (contendo resíduos de açúcar) por neutrófilos e monócitos para a produção de metabólitos do ácido araquidônico.

No presente estudo, os resultados como um todo deixam claro a complexidade dos mecanismos envolvendo o reconhecimento dos diversos microrganismos incluindo o *Paracoccidioides brasiliensis* pelas células da resposta imune inata. Esses mecanismos merecem ser mais bem estudados para que possamos eventualmente ter a chance de modular esse processo no sentido de favorecer os mecanismos de proteção ao hospedeiro.



Considerações Finais

8. Considerações Finais

1. Nossos resultados sugerem a participação de TLR2, MR, Dectina-1 e TLR4 no reconhecimento fúngico e consequente ativação da resposta imune ao *P.brasiliensis* e a cepa de maior virulência por induzir uma resposta de perfil mais desativador, possibilitaria um menor controle da infecção pelo hospedeiro.
2. Um mesmo PRR pode participar tanto da produção de mediadores pró como antiinflamatórios
3. O tipo de resposta ou os receptores que atuam com maior ou menor influência na produção das citocinas e eicosanóides, variam em função da cepa, do tempo de interação fungo/célula e do tipo celular.

9. Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade Natural. 6º ed. Elsevier editora LTDA. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Imunologia Celular e Molecular*, 2008; cap 2, 19-46.

Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, de Campos Soares AM. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol*. 2010 71(2):99-108.

Akira S Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.

Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padrón F, Blanco L, Rodríguez M, Fernández N, Crespo M. S. Eicosanoids in the Innate Immune Response: TLR and Non-TLR Routes. *Mediators Inflamm*. 2010: 201929.

Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. A role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol*. 2002; 40:377-82.

Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol*. 1996; 157: 5221-4.

Barros-Mazon S, Guariento ME, Silva CA, Coffman RL, Abrahamsohn IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol* 2004; 111: 137-145.

Bellocchio S , Montagnoli C , Bozza S , Gaziano R , Rossi G , Mambula SS, *et al.* The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3059-69.

Bellocchio S , Moretti S , Perruccio K , Fallarino F , Bozza S , Montagnoli C, *et al.* TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 2004; 173: 7406-15.

Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008 Apr-May;165(4-5):209-21. Review.

Bjerrum OW, Borregaard N. Dual granule localization of the dormant NADPH oxidase and cytochrome b559 in human neutrophils. *Eur J Haematol* 1989; 43(1): 67-77.

Bloom D, Jabrane-Ferrat N, Zeng L, Wu A, Li L, Lo D, *et al.* Prostaglandin E2 enhancement of interferon- γ production by antigen-stimulated type 1 helper T cells. *Cell Immunol* 1999; 194: 21-7.

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

Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Araújo Jr JP, Soares AMVC. Inhibitory effect of PGE₂ on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Microbes and Infection*. 2012a (in press).

Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Prostaglandin E2 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect*. 2007; 9(6): 744-7.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89-117.

Buret A, Cripps AW. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148: 793-805.

Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol*. 2006; 44:363-8.

Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, Ribeiro LR, de Cássia Valente-Ferreira R, Pina A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. 2008 Apr-May;165(4-5):223-36. Review.

Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 1-7.

Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Cienc Cult*. 1994; 46: 455-61.

Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, *et al*. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect*. 2003; 5:107-13.

Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*. 73, 369–509.

Coffey, M.J., Phare, S.M., Peters-Golden, M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v.71, p.185-90, 2004.

Davey MS, Tamassia N, Rossato M, Bazzoni F, Calzetti F, Bruderek K, Sironi M, Zimmer L, Bottazzi B, Mantovani A, Brandau S, Moser B, Eberl M, Cassatella MA. Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. *Nat Immunol*. 2011; 12: 1017-8;

De Santo C. *et al*. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nature Immunol*. 2010; 11: 1039–1046.

Dennehy KM , Ferwerda G , Faro-Trindade I , Pyz E , Willment JA , Taylor PR, *et al*. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2008; 38: 500-6.

Dennehy KM Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 253-8.

Dias-Melicio LA, Fernandes RK, Golim MA, Rodrigues DN, Soares AMVC. Interleukin 18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. *Inflammation Research*. Official Journal of The International Association of Inflammation Societies. 2011; 60: S167.

Diniz SN , Cisalpino PS , Freire AT , Silva-Teixeira DN , Contigli C , Rodrigues Junior V, *et al*. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol* 2001; 62: 799-808.

Diterich I, Rauter C, Kirschning CJ, Hartung T. *Borrelia burgdorferi* induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression. *Infect Immun* 2003; 71: 3979-3987.

Fernandez N, Gonzalez A, Valera I, Alonso S, and Sanchez Crespo M, “Mannan and peptidoglycan induce COX- 2 protein in human PMN via the mammalian

target of rapamycin,” *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 9, pp. 2572–2582, 2007.

Ferrari C, Bordon-Graciani AP, Acorci-Valério MJ, Dias-Melicio LA., Soares AMVC. Role of leukotrienes on the human monocyte in fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immuno Congress-Brazil*, 2009.

Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis* 2007; 196: 1108-15.

Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans. *J Infect Dis*. 2004; 189(11):2001-9.

Flynn JT, Hoff H. Lipopolysaccharide induces time-dependent increases in prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A2 mRNA in cultured human microvessel-derived endothelial cells. *Shock* 1995; 4(6): 433-440.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987 Apr-Jun;20(2):129-32.

Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993;5:115-49. Review.

Ganapathy V, Gurlo T, Jarstamarken H O, Von Grafenstein H. Regulator of TCR-induced IFN- γ release from islet-reactive non-obese diabetic CD8+ T cells by prostaglandin E2 receptor signaling. *Int Immunol* 2000; 12: 851-60.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; 197: 1107-17.

Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol* 1992b; 148: 1792-6.

Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol* 1992a; 22: 2501-6.

Gentile, D.A., Fireman, P., Skoner, D.P. Elevations of local leukotriene C4 levels during viral upper respiratory tract infections. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, v.91, p. 270-4, 2003.

González A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000; 68(5): 2546-52.

González A, Yáñez A, Gozalbo D, Gil ML. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54:365-74.

Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2007; 178: 3107-15.

Gosselin J, Savard M, Tardif M, Flamand L, Borgeat P. Epstein-Barr virus primes human polymorphonuclear leucocytes for the biosynthesis of leukotriene B4. *Clin Exp Immunol.* 2001; 126: 494-502.

Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic Cells Issued in vitro from bone marrow produce PGE₂ that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 2001; 209: 19-28.

Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S. Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends Immunol* 2005; 26: 352-4.

Hendricks A, Leibold W, Kalver V, Shuberth H J. Prostaglandin E2 is variably induced by bacterial superantigens in bovine mononuclear cells and has a regulatory role for the T cell proliferative response. *Immunology* 2000; 201: 493-505.

Hennet T, Ziltener HJ, Frei K, Peterhans EA. Kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus. *J Immunol.* 1992; 149: 932-9.

Hilkens C, Snijders A, Snijdewint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Modulation of T cell cytokine secretion by accessory cell derived products. *Eur Resp J Supl* 1996; 22: 90-94.

Hopkins H, Stull T, Von Essen SG, Robbins RA, Rennard SI. Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia. *Chest.* 1989; 95: 1021-7.

Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release. *J Biol Chem* 2002; 277(47): 44898-904.

Jimenez MP, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, Garcia LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. *Fems Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 56-66.

Kalinski P, Hilkens C, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. Dendritic cells obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂ promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 363-367.

Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 53-8.

Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 2002; 20: 56-62.

Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 2004; 112: 674-80.

Kasirga E, Coker I, Aydogdu S, Yagci RV, Taneli B, Gousseinov A. Blood levels of leukotrienes (LTC₄, D₄, E₄, B₄) and synthesis of leukotriene B₄ by peripheral leukocytes in children with acute A and B hepatitis. *Turk J Pediatr.* 1999; 41: 457-65.

Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* 2007; 37: 467-78.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.* 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

Lärfars G, Lantoiné F, Devynck MA, Palmblad J, Gyllenhammar H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B₄, C₄, and D₄ in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1999 Feb 15;93(4):1399-405.

LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007; 8(6):549-51.

Linehan SA, Martínez-Pomares I, Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect* 2000; 2: 279-88.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Araújo EF, Leite KR, Calich VL. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun.* 2010 Mar;78(3):1078-88.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):1279-90.

Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine* 2005; 32: 20-9.

Mancuso, P., Standiford D, T.J., Marshall, T., Peters-Golden, M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.*, v.66, p.5140-6, 1998.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity *Nat Rev Immunol.* 2011, 25; 11: 519-31.

Marks F, Fürstenberger G, Müller-Decker K. Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Recent Results Cancer Res.* 1999;151:45-67. Review.

Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun*. 2004 72: 1637-44.

Mendes RP, The gamut of clinical manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidiomycosis*. Boca Raton: CRC Press 1994; 233-58

Michelin MA, Figueiredo F, Cunha FQ. Involvement of prostaglandin in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exper Parasitol* 2002; 102: 170-177.

Nakaira-Takahagi E, Puccia R, Bannwart CF, Acorsi-Valério MJ, Golim MA, Peraçoli MTS. The glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* modulates TLR2 and TLR4 expression and cytokine production by human monocytes. *Med Microbiol Immunol* 2010. In Press.

Nakamura K , Miyagi K , Koguchi Y , Kinjo Y , Uezu K , Kinjo T, *et al*. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 148-54.

Netea MG , Gow NA , Munro CA , Bates S , Collins C , Ferwerda G, *et al*. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116: 1642-50.

Netea MG , Warris A , Van der Meer JW , Fenton MJ , Verver-Janssen TJ , Jacobs LE, *et al*. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* 2003; 188: 320-6.

Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002; 185: 1483-9.

Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2003; 21: 234-41.

Ohman L, Maluszynska G, Magnusson KE, Stendahl O. Surface interactions between bacteria and phagocytic cells. *Prog Drug Res* 1988; 32: 131-47.

Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002 Feb;4(2):139-44.

Ogus AC , Yoldas B , Ozdemir T , Uguz A , Olcen S , Keser I, *et al.* The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004; 23: 219-23.

Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 886-92.

Pathak SK , Basu S , Basu KK , Banerjee A , Pathak S , Bhattacharyya A, *et al.* Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 2007; 8: 610-8.

Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 2007; 9(4): 483-9.

Peters-Golden M, Coffey M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. *J Lab Clin Med* 1998; 132(4):251-7.

Peters-Golden, M., C. Canetti, P. Mancuso, and M. J. Coffey. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.*, v. 174, p. 589-594, 2005.

Phipps RP, Stein H, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of immune response. *Immunol Today* 1991; 12: 349-352.

Pinge-Filho P, Tadakoro CE, Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediated suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 1999; 193: 90-98.

Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* 2002; 218: 87-94.

Qadri, F., Raqib, R., Ahmed, F., Rahman, T., Wenneras, C., Das, S.K., Alan, N.H., Mathan, M.M., Svennerholm, A.M. Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.9, p.221-9, 2002.

Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, Garcia Hernandez ML, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002; 106: 257-66.

Reiser C, Bock G, Klocker H, Bartsh G, Thurnher M. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor- α cooperate to activate human dendritic cells synergistic activation of interleukin-12 production. *J Exp Med* 1997; 186: 1603-8.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985; 23(5): 323-34.

Restrepo, A.; Tobón, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.

Restrepo, A.; TOBÓN, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.

Ribeiro LRR, Calich VLG. The role of leukotrienes in pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM) and in the fungicidal and secretory ability of peritoneal macrophages infected by *Paracoccidioides brasiliensis*. In: IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2005, Lindóia. *Rev. Inst. Med. Rop. S. Paulo* 2005; 47: 27.

Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 2006; 7: 1258-65.

Romani L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol* 2008; 12:1-15.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 1-23.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011 Apr;11(4):275-88.

San-Blas G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 1993; 24: 267-8.

Sansonetti PJ. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 1237-42.

Santos, W. A.; Silva, B. M.; Passos, E. D.; Zandonade, E.; Falqueto, A. Associação entre tabagismo e paracoccidiodomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. Cad. Saúde Pública, v.19 p.1, 2003.

Schleifer KW, Mansfield MJ. Supressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. J Immunol 1993; 151: 5492-5503.

Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. Blood 2005; 106(3): 1067-75.

Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. J Immunol 2006; 177(5): 3201-8.

Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J 1996; 10(10): 1147-58.

Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. J Immunol 2001; 166: 4620-6.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiology 1994; 140 (Pt 5): 1189-94.

Singer-Vermes, LM.; Burguer, E.; Franco, MF.; Moscar, DI.; Bacchi, M.; Mendes-Giannini, MJS. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. J Med Mycol, v.27, p.71-82, 1989.

Smith WL, Dewitt DL, Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; 62: 167-215.

Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102: 480-485.

Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 2005 Dec;1(4):e42.

Suram S, Brown GD, Ghosh M. "Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the β -glucan receptor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 9, pp. 5506–5514, 2006.

Suram S, Gangelhoff TA, Taylor PR, Rosas M, Brown GD, Bonventre JV, Akira S, Uematsu S, Williams DL, Murphy RC, Leslie CC. Pathways regulating cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production in macrophages by *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2010 Oct 1;285(40):30676-85.

Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B (4) induces nitric oxide synthesis in infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4247-53.

Tarakhovsky AS, Kroemer G. Innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24: 1-2.

Taylor PR , Tsoni SV , Willment JA , Dennehy KM , Rosas M , Findon H, *et al.* Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 31-8.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-52.

Valera I, Vigo AG, Alonso S, Barbolla L, Sánchez Crespo M, and Fernandez N, "Peptidoglycan and mannose-based molecular patterns trigger the arachidonic acid cascade in human polymorphonuclear leukocytes," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, no. 4, pp. 925–933, 2007.

Van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002; 277: 48122- 48129.

Villamon E , Gozalbo D , Roig P , Murciano C , O'Connor JE , Fradelizi D, *et al.* Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in Candida-induced production of cytokines. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15: 263-71.

Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun* 2005; 73: 1553-60.

Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12 and interleukin-18 induced natural killer cell interferon- γ synthesis. *Immunology* 2004; 111: 298-305.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Delnegro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p.109-20.

Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, Levitz SM. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect Immun* 2004; 72: 5373-82.

10. ANEXOS

