

Daniela Ramos Rodrigues

**Papel de neutrófilos humanos no direcionamento da
resposta imune adaptativa do tipo Th1 contra o
*Paracoccidioides brasiliensis***

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

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Alarcão Dias-Melicio

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

Botucatu - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rodrigues, Daniela Ramos.

Papel de neutrófilos humanos no direcionamento da resposta imune adaptativa do tipo Th1 contra o *Paracoccidioides brasiliensis* / Daniela Ramos Rodrigues. - Botucatu: [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Coorientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio

Capes: 21102007

1. Paracoccidioidomicose. 2. Neutrófilos humanos. 3. Citocinas. 4. *Paracoccidioides brasiliensis*.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Receptores celulares; IFN- γ .

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu-SP e no Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Amaral Carvalho, Jaú - SP, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“A sabedoria inspira a vida aos seus filhos; Ela toma sob a sua proteção àqueles que a procuram; Aquele que a ama, ama a vida; Aqueles que velam para encontrá-la sentirão sua doçura. Aqueles que a possuem terão a vida como herança, e Deus abençoará todo lugar onde ele entrar. Ela o cumula de alegria, desvenda-lhe seus segredos e enriquece-o com tesouros de ciência, de inteligência e de justiça”

Eclesiástico, 4: 12-14, 20

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, pela orientação, confiança e incentivo. Acolheu-me mais uma vez, com atenção, carinho e espírito maternal, o que é da sua personalidade, contribuindo muito para a minha formação profissional e pessoal. À você Ângela, obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho e minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Walter e Jacira que ao longo da vida tem dispensado à mim amparo, dignidade, caráter, confiança, incentivo, determinação, exemplos e me apoiando em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Eduardo, Fernanda e Renato pelo apoio durante toda a minha trajetória e pelos momentos que não pude estar presente.

E aos meus amados sobrinhos, João Pedro e Silvia que chegaram na família para expandir os laços de amor e de afetos.

Agradecimentos

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

À minha Coorientadora Prof^a. Dr^a. Luciane Alarcão Dias-Melicio, pela amizade, paciência, companhia em vários momentos no laboratório e pela contribuição para o meu amadurecimento profissional.

Aos docentes da Imunologia, Dr. Silvio Luis de Oliveira, Dr. Ramon Kaneno, Dr^a. Alexandrina Sartori, Dr. José Maurício Sforcin, Dr^a. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, pelo apoio e amizade.

Aos docentes da Microbiologia e do curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais pelo apoio e amizade. Em especial, à amiga Prof^a. Dr^a. Sueli Aparecida Calvi, pela amizade, carinho, ajuda e incentivo durante todos estes anos.

Aos membros de minha banca de qualificação Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira e Prof. Dr. Ramon Kaneno pela contribuição e sugestões para a melhoria do trabalho.

À todos do laboratório de Imunologia da Paracoccidioidomicose, com carinho muito especial, aos amigos Reginaldo Keller Fernandes, Helanderson de Almeida Balderramas e Tatiana Fernanda Bachiega, pela amizade, por todos os momentos vividos nestes 4 anos, momentos de alegrias e euforias, tristezas e lágrimas e de toda ajuda nos finais de semana, algumas madrugadas e horas e horas em nosso laboratório. O meu muito obrigado, por me ajudarem na execução deste trabalho.

À todos do Laboratório de Citometria de Fluxo, Fundação Amaral Carvalho - Jaú, em especial à Marcimara Penitenti e a Dr^a. Maura V. Ikoma pela execução e análises dos protocolos de citometria de fluxo.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela amizade, apoio e pelos momentos de muita descontração.

Aos doadores de sangue, que se dispuseram à participar deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Luiz Severino dos Santos (Lula), Luiz Henrique Alquati, pela amizade, auxílio e por não terem medido esforços para me ajudar.

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

À 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 pelo apoio.

À sessão de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial à Regina Célia Spadim pela amizade e colaboração.

À bibliotecária Rosemeire Aparecida Vicente pela elaboração da ficha catalográfica e pelo auxílio prestado com dedicação.

Aos meus familiares, minha avó, tios e primos que contribuíram na minha caminhada até este momento.

Aos amigos de longa data, Adelaide Sanches, André Sanches, Adriano de Oliveira, Ana Beatriz Herreros, Ana Cláudia Pelizon, Anderson Deo, Cristiane Peres, Daniela de Almeida, Ederson Silva, Fabiana Cavalcanti, Fábio Alvarez, Fausto Neto, Luciana Ruiz, Mary Okamoto, Renata Rogick, Rennê Martins, Rita de Cássia, Rogéria Duarte, Rosana Martins, Rúbia Martins, Sueli Calvi, Talita Sanches, Thaisa Sanches, Thiago Marques, Verena Katriana pela grande amizade, paciência, sempre me dando forças para seguir e por todos os momentos vividos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro prestado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro, que viabilizou a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1. Resumo.....	16
2. Abstract.....	17
3. Introdução.....	18
4. Objetivos.....	23
5. Casuística e Métodos.....	24
5.1. Casuística.....	24
5.1.1. Comitê de Ética em Pesquisa.....	24
5.2. Isolamento de PMNs humanos a partir do sangue periférico.....	24
5.3. Purificação de PMNs humanos a partir da suspensão de células polimorfonucleares.....	24
5.4. Cultivo do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	25
5.5. Teste de viabilidade e obtenção das suspensões do <i>P. brasiliensis</i>	25
5.6. Avaliação da produção de IFN- γ por ELISA.....	26
5.7. Avaliação do efeito da incubação de PMNs humanos com as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 sobre a produção de IFN- γ em resposta ao desafio com <i>P. brasiliensis</i>	26
5.8. Avaliação da efetividade dos bloqueios dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 por citometria de fluxo.....	27
5.9. Efetividade dos bloqueios dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 por citometria de fluxo.....	27
5.10. Avaliação da expressão intracitoplasmática de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.....	28
5.11. Análise Estatística.....	28
6. Resultados.....	29
6.1. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos desafiados com a cepa Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>	29
6.2. Participação dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 na produção de IFN- γ por PMNs humanos.....	32
6.3. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos ativados com IL-12, IL-15 e IL-18.....	37
6.4. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos ativados com IL-12, IL-15 e IL-18 e desafiados com a cepa Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>	41

6.5. Avaliação da produção de IFN-γ por PMNs humanos tratados com combinações da citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 e desafiados com a cepa Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>.....	43
6.6. Expressão intracitoplasmática de IFN-γ por PMNs humanos tratados com IL-12, IL-15 e IL-18 e desafiados com a cepa Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> e avaliados por citometria de fluxo.....	46
7. Discussão.....	50
8. Considerações Finais.....	58
9. Referências Bibliográficas.....	59
10. Anexos.....	75

LISTA de ABREVIATURAS

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
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-CD-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>
CR3	Receptor de complemento 3
CXCL1 (GRO α)	Quimiocina ligante 1
CXCL6 (GCP2)	Proteína quimiotática de granulócitos 2
CXCL8 (IL-8)	Interleucina 8
DCs	Células dendríticas
DC-Sign	Dendritic Cell-Specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
EDTA	Ethylenediamine tetreacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FA	Forma adulta ou crônica
FJ	Forma juvenil ou aguda
FcyR	Fragmento cristalizável da imunoglobulina G
TITC	Isotiocianato de fluoresceína
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FSC	Limiar de dispersão frontal
Gp43	Glicoproteína 43
GPY	Glicose 1,5%, peptona 1% e extrato de levedura 0,5%
GXM	Glicuronoxilomanana
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HB-EGF	Fator de crescimento tipo EGF de ligação à heparina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1

IFN- γ	Interferon gama
IFN- α	Interferon alfa
IL	Interleucina
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL- 2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL- 4	Interleucina 4
IL- 5	Interleucina 5
IL- 6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL -10	Interleucina 10
IL -12	Interleucina 12
IL -15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL -18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
LPS	Lipopolissacáride de <i>Escherichia coli</i> O ₅₅ B ₅
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MO	Monócitos
MCCC	Meio de cultura de células completo
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MR	Receptor de manose
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
NK	Célula exterminadora natural
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
Pb18	Cepa de alta virulência do <i>P. brasiliensis</i>
Pb 265	Cepa de baixa virulência do <i>P. brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PE	Ficoeritrina

PI	Paracoccidioidomicose-infecção
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de estruturas moleculares padrões
Prokineticin 2	Receptor angiogênico acoplado á proteína G
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROIs	Reativos intermediários do oxigênio
RPMI	Meio de cultivo celular
SSC	Limiar de dispersão lateral
T CD4+	Linfócito TCD4+
TCD8+	Linfócito TCD8+
T CD4+ CD25+	Linfócito T regulador
<i>T. cruzi</i>	<i>Ttypanossoma cruzi</i>
TGF- α	Fator de transformação de crescimento alfa
TGF β 1	Fator de transformação de crescimento beta 1
TGF β 2	Fator de transformação de crescimento beta 2
Th	Linfócitos T helper (auxiliar)
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TLR1	<i>Toll-like receptor 1</i>
TLR2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLR6	<i>Toll-like receptor 6</i>
TLR2 ^{-/-}	Animais nocauteados para TLR2
TLR4 ^{-/-}	Animais nocauteados para TLR2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA de FIGURAS

1. “Dot-plot” e histogramas representativos da imunofenotipagem de PMNs isolados por seleção magnética positiva em relação à positividade para a molécula CD16.....	30
2. Produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao <i>P. brasiliensis</i>	31
3. “Dot-plot” e histogramas representativos da avaliação da expressão e bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal em cultura de PMNs humanos.....	34
4. “Dot-plot” e histogramas representativos da avaliação da expressão e bloqueio de TLR4 com anticorpo monoclonal em cultura de PMNs humanos.....	35
5. “Dot-plot” e histogramas representativos Avaliação da expressão e bloqueio de Dectina-1 com anticorpo monoclonal em cultura de PMNs humanos.....	36
6. Participação dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 na produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao <i>P. brasiliensis</i>	38
7. Efeito da IL-12 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos.....	39
8. Efeito da IL-15 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos.....	40
9. Efeito da IL-18 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos.....	42
10. Efeito da IL-12, IL-15 e IL-18 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao <i>P. brasiliensis</i>	44
11. (A, B e C) Efeito dos conjuntos de duas citocinas sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao <i>P. brasiliensis</i>	45
12. Porcentagem de PMNs humanos que expressam IFN- γ	47

13. Média de intensidade de fluorescência de PMNs humanos que expressam IFN- γ	48
14. “Dot-plot” e histogramas representativos da expressão intracitoplasmática de IFN- γ por PMNs.....	49

1. Resumo

Rodrigues, D. R. **Papel de neutrófilos humanos no direcionamento da resposta imune adaptativa do tipo Th1 contra o *Paracoccidioides brasiliensis***. 2013. 76f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), endêmica na América Latina. A resposta imune inata do hospedeiro contra o fungo já foi bem caracterizada e vários estudos demonstraram claramente a importância do papel desempenhado pelas células fagocíticas. O nosso laboratório tem estudado a relação entre os neutrófilos humanos (PMNs)/Pb, concentrando objetivos nos mecanismos efetores destas células contra o fungo. No entanto, nos últimos anos, os estudos demonstraram que, em adição às suas funções fagocíticas e “killing”, os PMNs podem modular e instruir a resposta imune, uma vez que estas células têm sido mostradas liberando e produzindo várias citocinas. Assim, avaliamos se PMNs estimulados com Pb podem modular a resposta imune para um padrão de resposta do tipo Th1, através da produção de IFN- γ (IFN-gama), bem como o papel dos “receptores de reconhecimento de estruturas moleculares padrões” (PRRs), tais como o TLR2, TLR4 e Dectina-1 nesta produção. Além disso, foi perguntado se a ativação das células com as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 poderiam resultar em níveis aumentados dessa citocina. Os PMNs foram obtidos do sangue periférico de 20 doadores saudáveis e foram ativados ou não com IL-12, IL-15 ou IL-18 em diferentes concentrações e desafiados com a cepa (Pb18) durante 2h, 4h, 12h, 24h e 48h e avaliados para a produção de IFN- γ , por meio de ELISA. Em outros experimentos, os PMNs foram tratados com anticorpos monoclonais anti-TLR2, TLR4 e Dectina-1, estimulados com Pb e avaliados para a produção de IFN- γ . Descobrimos que o Pb induz PMNs humanos para produção de IFN- γ , provavelmente por ligação aos receptores TLR4 e Dectina-1 expressos por estas células. Além disso, os níveis de IFN- γ foram significativamente aumentado, quando as células foram ativadas com cada uma das citocinas testadas, ou uma combinação de duas delas, sendo a associação de IL-12 mais IL-15, a mais eficaz. Os resultados apoiam a hipótese de que durante a infecção por Pb, PMNs humanos via produção de IFN- γ modulam a resposta imune adaptativa para um padrão de resposta do tipo Th1.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Neutrófilos humanos, IFN- γ , PRRs, resposta Th1

2. Abstract

Rodrigues, D. R. **Role of human neutrophils in directing the adaptive immune response Th1 against *Paracoccidioides brasiliensis***. 2013. 76f. Thesis (Ph.D.) - Botucatu School of Medicine, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), which is endemic in Latin America. The host innate immune response against the fungus has been well characterized and several studies have clearly shown the important role played by phagocytic cells. Our laboratory has studied the relationship between human neutrophils (PMNs)/Pb, focusing the effector mechanisms of these cells against the fungus. However, in last years, studies have shown that in addition to their phagocytic and killer functions, PMNs can modulate and instruct the immune response, since these cells have been shown to produce and release several cytokines. Thus, we evaluated whether PMNs stimulated with Pb can modulate the immune response to a Th1 phenotype through the production of IFN- γ (IFN-gamma), as well as the role of “pattern-recognition receptors” (PRRs) such as TLR2, TLR4 and Dectin-1 in this production. Furthermore, we asked whether activation of the cells with the cytokines IL-12, IL-15 and IL-18 could result in increased levels of this cytokine. Peripheral blood PMNs obtained from 20 healthy donors were nonactivated or activated with IL-12, IL-15 or IL-18 in different concentrations and challenged with strain 18 Pb (Pb18) for 2h, 4h, 12h, 24h and 48h and evaluated for IFN- γ production, by ELISA. In other experiments, PMNs were treated with monoclonal antibodies anti-TLR2, TLR4 and Dectin-1, challenged with Pb and evaluated for IFN- γ production. We found that Pb induces human PMNs to produce IFN- γ , probably by binding to TLR4 and Dectin-1 receptors expressed by these cells. Moreover, IFN- γ levels were significantly increased when cells were activated with each of the tested cytokines or a combination of two of them, being the association IL-12 plus IL-15 the most effective. The results support our hypothesis that during infection by Pb, human PMNs via the of IFN- γ production modulate the adaptive immune response to a Th1 response pattern.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, Human neutrophils, IFN- γ , PRRs, Th1 response

3. 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* (*P. brasiliensis*), é um fungo dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* ou 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 & Tóbon, 2005).

Afeta principalmente trabalhadores rurais, que estão constantemente em contato com a vegetação e o solo. Na forma aguda da doença, jovens de ambos os sexos são afetados proporcionalmente. Porém, na forma crônica do adulto há predominância de homens com número reduzido de mulheres afetadas, sendo esse processo relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos. Estudos *in vitro* demonstram que estrógenos atuam inibindo a transformação de micélios ou conídios em leveduras, evento que proporciona a instalação da infecção (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988). Paralelamente, foi demonstrada a presença de receptores para estrógeno tanto na fase micelial como na leveduriforme do fungo (Loose *et al.*, 1983; Stover *et al.*, 1986).

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos presentes em água, plantas e solo, que penetrariam no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando o chamado complexo primário pulmonar. Esse processo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção, identificada pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (Oliveira *et al.*, 2002). Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais pela via linfo-hematogênica (Franco *et al.*, 1987; 1989). As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas aguda e crônica da doença. A aguda é habitualmente grave, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A crônica 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 paracoccidioidomicose-infecção ou paracoccidioidomicose-doença nas suas formas mais ou menos graves depende principalmente das complexas interações parasita-hospedeiro que podem resultar em uma resposta imune mais ou menos eficaz por parte deste último. Neste contexto, muitos estudos clínicos e experimentais realizados com o objetivo de

caracterizar a resposta imune do hospedeiro infectado mostraram uma importante participação tanto da resposta imune inata como adaptativa (Benard, 2008; Calich *et al.*, 2008a).

Os mecanismos da resposta imune inata desempenham um importante papel no combate a fungos patogênicos. Dentre eles, destacam-se as células fagocitárias que participam como células efectoras diretas exercendo atividade fungicida/fungistática e como moduladoras da própria resposta inata assim como da resposta adaptativa que será desenvolvida posteriormente (Nicola *et al.*, 2008). Dentro deste contexto, os estudos na paracoccidioidomicose têm se dedicado a avaliar principalmente o papel dos monócitos/macrófagos.

No caso do *P. brasiliensis*, cuja infecção atinge primeiramente os pulmões, acredita-se que a resposta inicial seja mediada pelos macrófagos alveolares. Após serem inalados, os conídios do fungo são fagocitados por essas células e convertidos em leveduras (McEween *et al.*, 1987). Esta fagocitose pode ocorrer através de receptores opsônicos e não opsônicos. Assim, estudos têm mostrado a participação do receptor para complemento (CR3) (Calich *et al.*, 1979) uma vez que o *P. brasiliensis* é capaz de ativar esse sistema pela via alternativa (Munk *et al.*, 1992) ou pela via da lectina (Toledo *et al.*, 2010), dos receptores do tipo Toll (TLRs) (Bonfim *et al.*, 2009; Calich *et al.*, 2008b) ou ainda do tipo Manose (MR) (Popi *et al.*, 2002).

Após o processo de fagocitose, as atividades efectoras diretas dessas células, assim como as moduladoras, dependerão das complexas interações que serão estabelecidas com o fungo e com as outras células presentes no infiltrado inflamatório. Nesse sentido, citocinas liberadas pelos próprios macrófagos ou ainda por outras células como as NK, têm um papel primordial. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que monócitos/macrófagos na presença de IFN- γ , TNF- α , GM-CSF exercem atividade fungicida e ou fungistática contra o fungo (Brummer *et al.*, 1988a e b, 1989; Calvi *et al.*, 2003a e b; Cano *et al.*, 1992a e b; Cano *et al.*, 1998; Carmo *et al.*, 2006; González *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2008; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Souto *et al.*, 2000, Bannwart *et al.*, 2010). Por outro lado, citocinas que levam a uma desativação dessa resposta têm sido relatadas, como a IL-10, que bloqueia a ativação por IFN- γ ou TNF- α de macrófagos murinos (Moreira *et al.*, 2010) culminando com inibição da atividade fungicida dessas células.

Esses estudos reforçam a idéia de que os macrófagos através da liberação de citocinas são importantes moduladores da resposta imune inata uma vez que de uma forma autócrina conseguem modular as suas próprias atividades antifúngicas e provavelmente as de outras células. De fato, estudos têm mostrado que monócitos liberam tanto citocinas pró como antiinflamatórias em resposta ao fungo (Kurokawa *et al.*, 2007). Uma modulação positiva ou negativa dependerá do balanço entre a liberação de citocinas ativadoras como o TNF- α e o GM-CSF e as desativadoras como a IL-10. Esse processo parece estar vinculado principalmente à cepa do fungo e a sua capacidade de induzir a liberação de um ou outro tipo de citocina (Calvi *et al.*, 2003a)

A liberação de citocinas pró e antiinflamatórias pelos monócitos/macrófagos além de possibilitar que essas células influenciem a resposta inata, permitem considerar o potencial dessas células como moduladoras da resposta imune adaptativa. No entanto, não existem estudos na paracoccidiodomicose objetivando avaliar especificamente esse papel.

Outro mecanismo regulador importante das atividades antifúngicas diretas e moduladoras das células fagocitárias envolve a ligação do fungo a determinados receptores de reconhecimento de estruturas moleculares padrões (PRRs). 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 (DCs). Estes incluem principalmente os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores do tipo lectinas 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).

Os trabalhos citados mostram o interesse da literatura em estabelecer os papéis efetores e moduladores das células fagocíticas mononucleares murinas e humanas, desafiadas com o *P. brasiliensis*. No entanto, nos sítios inflamatórios da doença humana (Franco *et al.*, 1982), e de diferentes modelos experimentais (Iabuki *et al.*, 1979, Kerr *et al.*, 1988, Calich, 1994), tem sido encontrada uma infiltração maciça de PMNs, provavelmente como resultado da liberação de quimiocinas (Souto *et al.*, 2003) que sugere-se, possam ser liberadas pelos macrófagos que estabeleceram um contato inicial com o fungo (Calich *et al.*, 1985a). Assim, da mesma forma que os monócitos/macrófagos o papel dessas células deve merecer atenção por parte dos pesquisadores. Uma vez infiltradas essas células são extremamente importantes para os mecanismos de defesa do hospedeiro (Meloni-Bruneri *et al.* 1996) particularmente nos animais com maior suscetibilidade à infecção (Pina *et al.*, 2006; Souto *et al.*, 2003).

Os PMNs são classicamente caracterizados como células de vida curta participando da resposta imune basicamente como células efectoras diretas contra os microrganismos. Assim, essas células após serem recrutadas ao local da infecção internalizam e destroem os agentes infecciosos pela formação sequencial de fagossomos, recrutamento de lisossomos e vários tipos de grânulos para liberação de enzimas proteolíticas/peptídeos microbicidas, e formação de radicais livres, para mediar a morte de patógenos endocitados (Segal, 2005; Nathan, 2006). Alguns estudos *in vitro* avaliaram o papel efector dessas células contra o *P. brasiliensis*. Os primeiros mostraram que PMNs humanos não ativados apresentam atividade fungistática (Kurita *et al.*, 1999) e fungicida contra o *P. brasiliensis* (Kurita *et al.*, 2005). No entanto, esses efeitos antifúngicos são significativamente aumentados após a ativação com citocinas (Kurita *et al.*, 1999; Kurita *et al.*, 2000). Trabalho

semelhante realizado em nosso laboratório mostrou que PMNs não ativados não apresentam atividade fungicida contra o fungo. No entanto, uma significativa atividade fungicida é obtida após a incubação com IFN- γ , TNF- α , GM-CSF ou IL-15 (Rodrigues et al., 2007, Tavian *et al.*, 2007). Os estudos ainda mostraram que os mecanismos efetores dos PMNs ativados contra o fungo envolvem a participação do ânion superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por outro lado, fatores que levam a uma desativação dessas células têm sido relatados, como a IL-10, que bloqueia a ativação por IFN- γ ou TNF- α de PMNs humanos culminando com inibição da produção de H_2O_2 e consequentemente da atividade fungicida dessas células (Costa *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a visão limitada dos PMNs como células efetoras terminais e com limitada capacidade de orquestrar a resposta imune foi desafiada pela demonstração de que os PMNs sobrevivem muito mais do que inicialmente sugerido (Galli *et al.*, 2011; Tofts *et al.*, 2011) e podem ser induzidos a expressar genes que codificam importantes mediadores inflamatórios, (Colotta *et al.*, 1992; Cassatella, 1999; Brinkmann *et al.*, 2004; Amulic *et al.*, 2012; Thomas & Schroder, 2013).

Assim, em resposta ao dano tecidual ou na presença de agentes patogênicos, uma variedade de células do hospedeiro tais como monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e epiteliais, produzem e secretam potentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos para PMNs. Estes mediadores incluem IL-8 (IL-8, CXCL8), GRO α (CXCL1) proteína 2 quimiotática de PMNs (GCP2, CXCL6) e leucotrieno B4 (LTB4) que se ligam a receptores específicos na superfície dos PMNs. Estes sinais quimiotáticos de PMNs os levam da circulação intravascular para os sítios de lesão ou infecção nos tecidos, resultando num rápido influxo e acúmulo dessas células. A produção destes fatores quimiotáticos modula os PMNs que coordenam a participação de outros tipos celulares, como monócitos, macrófagos, DCs e linfócitos, proporcionando assim uma importante ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Kevin *et al.*, 2011). Silva & Correia-Neves (2012), reforçaram essa idéia relatando que PMNs, monócitos, macrófagos e DCs exercem suas funções de forma cooperativa, no sentido de induzir a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. Assim, os PMNs, células efetoras do sistema imune inato ressurgiram como componentes reguladores do sistema imune adaptativo o que conduziu a um renovado interesse em sua biologia, particularmente na sua capacidade de secretar e liberar citocinas (Nathan, 2006; Mantovani *et al.*, 2011).

A produção de citocinas por PMNs é controlada por mecanismos reguladores que atuam em diferentes níveis, incluindo transcrição, estabilidade ou tradução do mRNA, bem como a secreção de proteínas (Cassatella, 1999). Estas células, seja espontaneamente ou após estímulos, expressam e/ou produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-18, IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-17, TNF), citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF β 1, TGF β 2), citocinas imunoreguladoras (IFN- γ , IFN-

α , IL-12, IL-23) e fatores estimuladores de colônias de granulócitos (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3). PMNs também secretam quimiocinas e numerosos fatores angiogênicos (HB-EGF, HGF, FGF2, TGF- α , VEGF, *prokineticin 2*). A expressão e/ou produção destes fatores têm sido comprovados não só por meio de técnicas de expressão genética, mas também por imunohistoquímica, ELISA ou em ensaios biológicos, realizados com células humanas e/ou de camundongos (Cassatella, 1999; Jaillon *et al.*, 2013; Scapini *et al.*, 2008).

Vários trabalhos têm mostrado que uma resposta adaptativa protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta do tipo Th1 envolvendo citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Arruda *et al.*, 2002; Calich *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2002).

O IFN- γ tem um papel crucial no direcionamento de uma resposta Th1. A síntese inicial dessa citocina parece ser requerida para a geração de IL-12, essencial para a diferenciação dessas células. Assim, a produção de IFN- γ durante a resposta imune inata garantiria um direcionamento para esse padrão de resposta adaptativa. As principais células envolvidas na produção de IFN- γ durante a resposta imune inata são as NK. No entanto, dentro da idéia de que os PMNs podem ter um importante papel na instrução da resposta imune adaptativa, alguns estudos mostram que essas células também podem constituir fontes importantes dessa citocina (Yoshimoto *et al.*, 1997; Munder *et al.*, 1998; Woerly *et al.*, 1999; Fehniger *et al.*, 2000; Ethuin *et al.*, 2001; Ariel *et al.*, 2002).

Com base no exposto, podemos hipotetizar que, além de seu papel efetor, os PMNs podem modular a resposta imune ao *P. brasiliensis*, favorecendo o estabelecimento de uma resposta adaptativa do tipo Th1, nitidamente protetora na paracoccidiodomicose. Esse processo pode ocorrer após a ligação do *P. brasiliensis* a essas células via um determinado PRR que emitiria sinais de ativação para a produção especificamente de IFN- γ , e pode ser modulado por citocinas produzidas pelos próprios PMNs, que atuariam de uma forma autócrina, ou por outras células, como os macrófagos. Sugere-se que as citocinas mais importantes nesse processo são a IL-12, IL-15 e IL-18 já descritas como estimuladoras da atividade de células NK (Kawakami *et al.*, 1997; Qureshi *et al.*, 1999; Fehniger *et al.* 2000).

4. Objetivos

- A) Avaliar se PMNs humanos desafiados com o *P. brasiliensis* produzem IFN- γ .
- B) Avaliar a participação de receptores de reconhecimento de estruturas padrões como TLR2, TLR4 e Dectina-1 sobre a produção desta citocina em resposta ao fungo.
- C) Avaliar o efeito das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 sobre essa produção.

5. Casuística e Métodos

5.1. Casuística

Foram avaliados PMNs do sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro 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.

5.1.1. Comitê de Ética em Pesquisa

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - SP (OF. 111/2010 - CEP).

5.2. Isolamento de PMNs humanos a partir do sangue periférico

Foram coletados 20mL de sangue periférico por indivíduo, em tubos estéreis contendo 40U/mL de heparina (Liquemine-Roche). As células foram obtidas por meio da centrifugação dos tubos em gradiente de Histopaque (*Sigma-Aldrich*) de densidades 1119 e 1083g/mL por 30 minutos, 460g, 25°C. O anel rico em células polimorfonucleares foi coletado e as células lavadas com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2mM de L-glutamina, 40µg/mL de gentamicina (*Sigma-Aldrich*), por 10 minutos, 350g, 4°C.

5.3. Purificação de PMNs humanos a partir da suspensão de células polimorfonucleares

Para a obtenção de suspensão purificada de PMNs a partir da população de células polimorfonucleares obtidas no item 5.2, utilizamos a técnica na qual anticorpos monoclonais são acoplados a microesferas magnéticas (“magnetic cell sorting” - MACS *Miltenyi Biotec*). O kit utilizado foi o CD16⁺ (*MicroBeads human - Miltenyi Biotec*), pois utilizamos como marcador da população de PMNs a molécula CD16. Inicialmente a suspensão celular foi ressuspensa em tampão PBS pH 7.2, 0.5% BSA e 2 mM EDTA obtido através da diluição do reagente “MACS BSA Stock solution” em “autoMACS Rinsing Solution” em uma proporção de 1:20, seguida por centrifugação por 10 minutos, 300g, 4°C. Após, a suspensão foi incubada por 30 minutos (4 - 8°C) em solução de anticorpo monoclonal anti-CD16 acoplado a esferas magnéticas seguida pela colocação da suspensão em colunas acopladas a uma plataforma magnética. Assim, as células

CD16⁺ ficaram retidas na coluna (seleção positiva). Após a remoção da coluna do campo magnético, as células CD16⁺ retidas foram eluídas e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2mM de L-glutamina, 40µg/mL de gentamicina (*Sigma-Aldrich*) e 10% de soro bovino fetal (*LGC Systems*) (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC). A contagem de células viáveis foi realizada através de coloração com azul tripan. A concentração foi ajustada para 2x10⁶ PMNs/mL de MCCC e/ou para 1x10⁶ PMNs/mL de MCCC, com posterior plaqueamento das células em placas de microculturas de 96 orifícios (100µL/orifício) ou em placas de macroculturas de fundo chato de 24 orifícios (1000µL/orifício). As células foram incubadas, em tensão de 5% de CO₂ a 37°C, com diferentes estímulos e/ou bloqueios, na dependência do ensaio a ser realizado.

5.4. Cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis*

Foi utilizada a cepa de alta virulência de *P. brasiliensis* (Pb18) mantida em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY, (2% de glicose, 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura à 37°C), em tubos de 20 x 20mm, com subcultivos semanais. As cepas de *P. brasiliensis* foram utilizadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

5.5. Teste de viabilidade e obtenção das suspensões do *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas conforme descrito anteriormente. Após 5 ou 6 dias, essas células foram coletadas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e aproximadamente 10mL de meio RPMI1640 (*Sigma-Aldrich*), com posterior homogeneização em agitador de tubos tipo *Vortex* por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas durante 5 minutos a 37°C para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação.

Após este período, os sobrenadantes dessas suspensões foram coletados, sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo *Neubauer*, utilizando microscópio com contraste de fase, seguido do ajuste da concentração para 4x10⁴ e/ou 2x10⁴ células leveduriformes/mL. Foram consideradas como células viáveis as que apresentaram aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. Foram utilizadas suspensões com viabilidade maior ou igual 90%.

5.6. Avaliação da produção de IFN- γ por ELISA

A quantificação de IFN- γ nos sobrenadantes pela técnica de ELISA foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (*kit DuoSet - Human IFN- γ - R&D Systems*).

5.7. Avaliação do efeito da incubação de PMNs humanos com as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 sobre a produção de IFN- γ em resposta ao desafio com *P. brasiliensis*

Culturas de células na concentração de 2×10^6 /mL foram desafiadas com Pb18 na concentração de 4×10^4 leveduras/mL (relação fungo/PMN 1:50) na presença das citocinas IL-12 (5, 10, 20, 50 e 100ng/mL), IL-15 (5, 10, 20, 50 e 100ng/mL) e IL-18 (5, 10, 20, 50 e 100ng/mL), isoladamente ou em conjunto, por períodos de 2, 4, 12, 24 e 48 horas seguido de coleta dos sobrenadantes para avaliação da produção de IFN- γ por ELISA.

5.8. Avaliação da efetividade dos bloqueios dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 por citometria de fluxo.

Culturas de PMNs obtidas de acordo com os itens 5.2 e 5.3. foram incubadas com anticorpos monoclonais (exceto aos poços destinados ao controle positivo), anti-TLR2 (*Biolegend*) conjugado com FITC (*Fluorescein*), anti-TLR4 (*Biolegend*) conjugado com PE (*Phycoerythrin*) e anti-Dectina-1 (*R&D Systems*) conjugado com PerCP (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex*) em variadas concentrações (2, 3 e $3,5 \mu\text{g}/10^6$ células para anti-TLR2; 2, 3, $4 \mu\text{g}/10^6$ células para anti-TLR4 e 3, 4 e $4,5 \mu\text{g}/10^6$ células para anti-Dectina-1). Após a adição dos anticorpos monoclonais, as culturas foram mantidas por 2h em tensão de 5% CO₂ a 37°C sendo em seguida transferidas para tubos de citometria (*Falcon, BD - Becton-Dickinson USA*) e centrifugadas por 10 minutos a 1500rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e aos tubos foram adicionados 20uL dos respectivos anticorpos conjugados com os fluorocromos descritos acima, (inclusive nos tubos de controle positivo) por 30 minutos e completados com 1mL de ISOTON. Na sequência, os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante descartado e as células fixadas com 50 μ L de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD - *Becton-Dickinson USA*) e analisadas quanto a expressão de TLR2, TLR4 e Dectina-1, por citometria de fluxo. Para cada teste foi feito um tubo de controle isotipo marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As

análises foram feitas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD - *Becton Dickinson* USA), usando programa *CellQuest* (BD - *Becton Dickinson* USA) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares.

5.9. Efetividade dos bloqueios dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 por citometria de fluxo.

Culturas de PMNs na concentração de 1×10^6 /mL obtidas de acordo com o item 5.2 e 5.3 foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 ($3,5 \mu\text{g}/10^6$ de células), anti-TLR4 ($4 \mu\text{g}/10^6$ de células) e anti-Dectina-1 ($3 \mu\text{g}/10^6$ de células) concentrações essas que tiveram maior índice de bloqueio verificado através do ensaio descrito em 5.8. Foi adotado um esquema que permitisse que a cada avaliação, dois receptores ficassem bloqueados e somente o receptor a ser avaliado ficasse desbloqueado. Após os bloqueios, as culturas foram tratadas ou não com Pb18 (relação fungo/PMN 1:50), por períodos de 24 e 48 horas a 37°C , em atmosfera constante de 5% de CO_2 , seguido de coleta dos sobrenadantes para avaliação da produção de IFN- γ por ELISA.

5.10. Avaliação da expressão intracitoplasmática de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao *P. brasiliensis* por citometria de fluxo

Culturas de PMNs (1×10^6 /mL) foram incubadas com as citocinas IL-12 (10 e 20 ng/mL) ou IL-15 (50 e 100 ng/mL) ou IL-18 (50 e 100 ng/mL) formando as seguintes combinações: A) (IL-12 + IL-15), B) (IL-12 + IL-18) e C) (IL-15 + IL-18) desafiadas ou não com Pb18 (relação fungo/PMN 1:50) mantidas por 24h em tensão de 5% CO_2 a 37°C . Seis horas antes do término de cultivo, as culturas foram tratadas com *Brefeldin A* ($1 \mu\text{L}$ da solução 1000x concentrada em $999 \mu\text{L}$ de RPMI) para impedir a liberação das citocinas do citoplasma celular. Após o período final de cultura, os sobrenadantes foram retirados, as culturas coletadas e transferidas para os tubos de citometria (*Falcon*, BD - *Becton-Dickinson* USA) que foram centrifugados por 10 minutos a 1500rpm. Em seguida, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e adicionado $100 \mu\text{L}$ de solução A de permeabilização do kit Fix & Perm (*ADG Bio Research*), incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos no escuro, centrifugadas, retirados cuidadosamente os sobrenadantes e adicionado $100 \mu\text{L}$ de solução B de permeabilização do kit Fix & Perm (*ADG Bio Research*) na presença de anticorpo anti-IFN- γ humano conjugado com PE (*Phycoerythrin*) (*Biolegend*) por 15 minutos no escuro. As células também foram incubadas com anticorpo monoclonal controle isotipo marcado com o respectivo

fluorocromo. A seguir, as células foram lavadas com isotom e na sequência os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante descartado e as células marcadas fixadas com 50µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD - *Becton-Dickinson* USA) e analisadas quanto a expressão intracitoplasmática de IFN- γ por citometria de fluxo. Para cada teste foi feito um tubo de controle isotipo marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As análises foram feitas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD - *Becton Dickinson* USA), usando programa *CellQuest* (BD - *Becton Dickinson* USA) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares.

5.11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *GraphPad Prism Version 5.01* para *Windows*, *GraphPad Software, Inc.*, (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*, assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro fosse menor que 5% ($p < 0,05$).

6. Resultados

6.1. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*

Os ensaios de imunofenotipagem, por citometria de fluxo, mostraram que a população celular isolada é altamente purificada de PMNs, uma vez que não apresentaram marcadores típicos de linfócitos e células NK (CD56) e linfócitos (CD3) (Figura 1). Esse resultado é extremamente importante uma vez que, essas populações celulares são potencialmente produtoras de IFN- γ . A partir desse resultado, a produção da citocina pode realmente ser atribuída aos PMNs.

Iniciamos os experimentos avaliando se PMNs humanos não ativados produzem IFN- γ em resposta ao desafio com Pb18 (relação fungo/PMN 1:50). A figura 2 mostra que houve uma produção baixa da citocina, nos períodos de 2, 4 e 12 horas. No entanto, um aumento dos níveis foi detectado após 24 e 48 horas de incubação, com diferenças significativas no período de 24h.

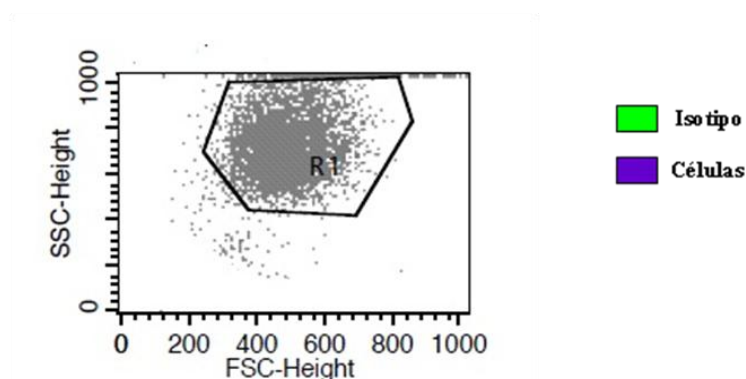
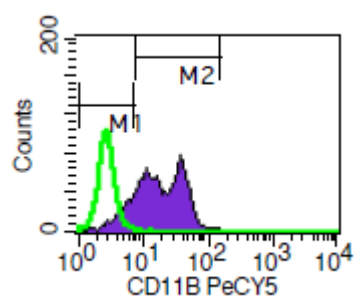
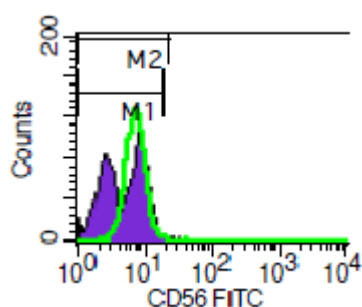
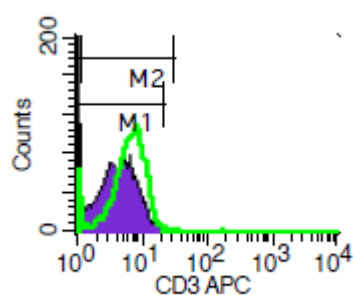
Figura 1.**A****B****C****D**

Figura 1. “Dot-plot” e histogramas representativos da imunofenotipagem de PMNs isolados por seleção magnética positiva em relação à positividade para a molécula CD16. Células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas com anticorpos monoclonais anti CD11b, CD56 e CD3 humanos conjugados com PEY5, FITC e APC, respectivamente, e avaliados por citometria de fluxo. 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). Histogramas na cor verde correspondem aos resultados dos isotipos controles e os roxos aos dos anticorpos monoclonais específicos. B, C e D mostram a intensidade de fluorescência em relação à expressão das moléculas CD11b, CD56 e CD3, respectivamente.

Figura 2.

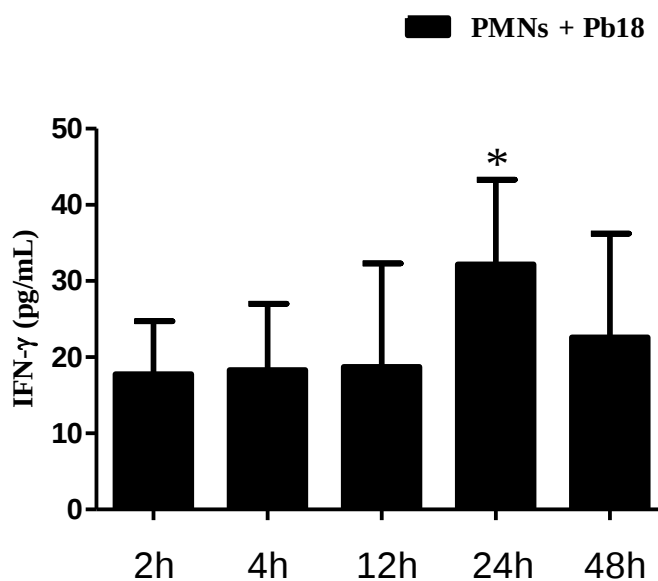


Figura 2. Produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao *P. brasiliensis*. Células (2×10^6 /mL) não ativadas e desafiadas com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (4×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) por 2, 4, 12, 24 e 48 horas foram avaliadas quanto à produção de IFN- γ pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos). * $p < 0.05$ x 2, 4 e 12h.

6.2. Participação dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 na produção de IFN- γ por PMNs humanos

Após observarmos que o *P. brasiliensis* induz a produção de IFN- γ por PMNs humanos objetivamos avaliar a participação dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 nessa produção. Para isso, utilizamos ensaios de bloqueio desses receptores com anticorpos monoclonais. Inicialmente, estabelecemos quais concentrações dos anticorpos monoclonais anti-TLR2, anti-TLR4 e anti-Dectina-1 seriam mais efetivas nos bloqueios dos respectivos receptores. Testamos as concentrações de (2, 3 e 3,5 μ g/10⁶ células de anti-TLR2; 2, 3, 4 μ g/10⁶ células de anti-TLR4 e 3, 4 e 4,5 μ g/10⁶ células de anti-Dectina-1). As figuras 3 a 5 mostram histogramas representativos dos resultados obtidos com as concentrações que determinaram os melhores índices de bloqueio, que foram 3,5 μ g/10⁶ células para anti-TLR2 (73,12% de bloqueio), 4 μ g/10⁶ células para anti-TLR4 (70,96%) e 3 μ g/10⁶ para anti-Dectina-1 (50%). Uma vez observado o bloqueio dos três receptores, passamos aos ensaios propriamente ditos, referentes ao envolvimento destes receptores. Os resultados referentes à participação dos três receptores na produção de IFN- γ por PMNs humanos desafiados com a cepa Pb18 (relação fungo/PMN 1:50) por 24 e 48 horas podem ser observados na Figura 6. Nestes ensaios, o protocolo foi estabelecido de forma que a cada bloqueio somente um dos receptores ficasse disponível e assim avaliado individualmente. Nos ensaios de 24 horas, o bloqueio de Dectina-1 e TLR4 resultaram em uma diminuição significativa da produção de IFN- γ sugerindo a participação de pelo menos um desses receptores. Nos ensaios em que TLR4 ficou disponível a produção da citocina foi semelhante à detectada quando nenhum dos receptores foi bloqueado. Resultados semelhantes foram obtidos quando houve disponibilidade somente do Dectina-1. O mesmo perfil de resposta foi detectado no período de 48h, no entanto, níveis maiores da citocina foram liberados neste período em relação aos detectados em 24 horas. Em conjunto, os resultados mostram a participação tanto de TLR4 como de Dectina-1 na produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao *P. brasiliensis*.

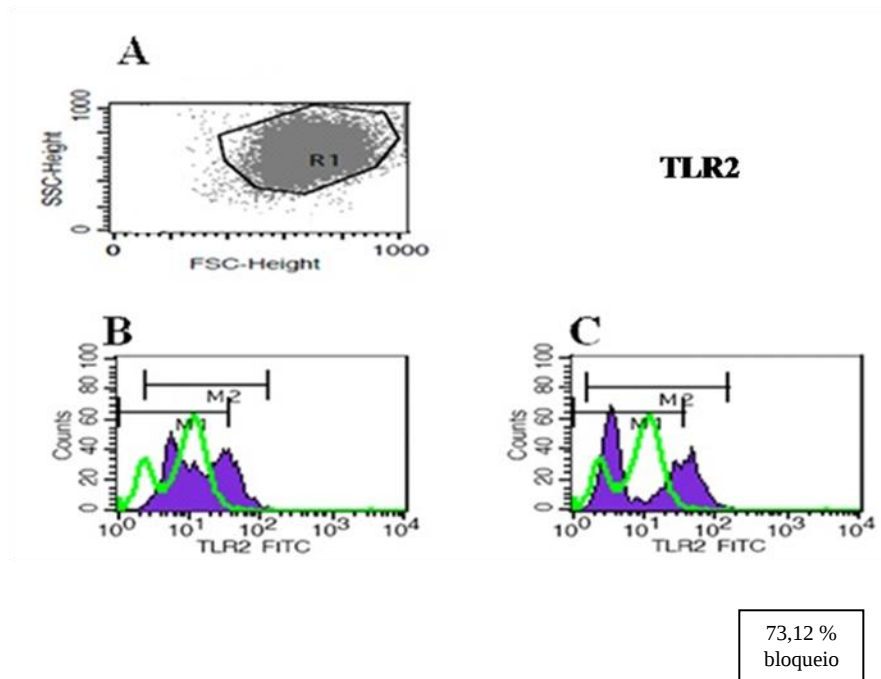
Figura 3.

Figura 3. “Dot-plot” e histogramas representativos da avaliação da expressão e bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal em cultura de PMNs humanos ($1 \times 10^6/\text{mL}$). 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) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e controle positivo (roxo) e (C) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de bloqueio (roxo). Abaixo do histograma C está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais. Representativo de $n = 4$ indivíduos.

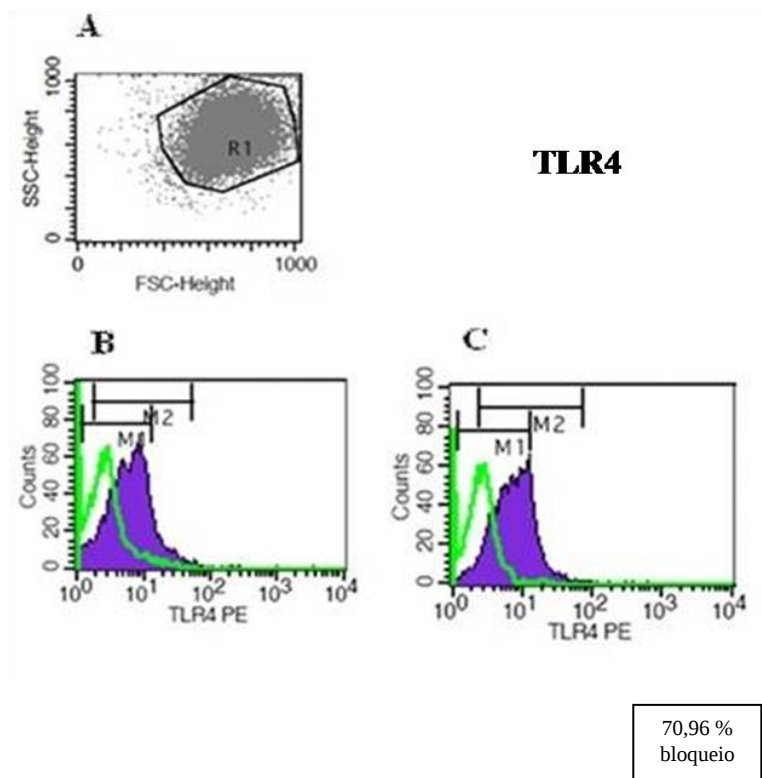
Figura 4.

Figura 4. “Dot-plot” e histogramas representativos da avaliação da expressão e bloqueio de TLR4 com anticorpo monoclonal em cultura de PMNs humanos ($1 \times 10^6/\text{mL}$). 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**) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e controle positivo (roxo) e (**C**) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de bloqueio (roxo). Abaixo do histograma **C** está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais. Representativo de $n = 4$ indivíduos.

Figura 5.

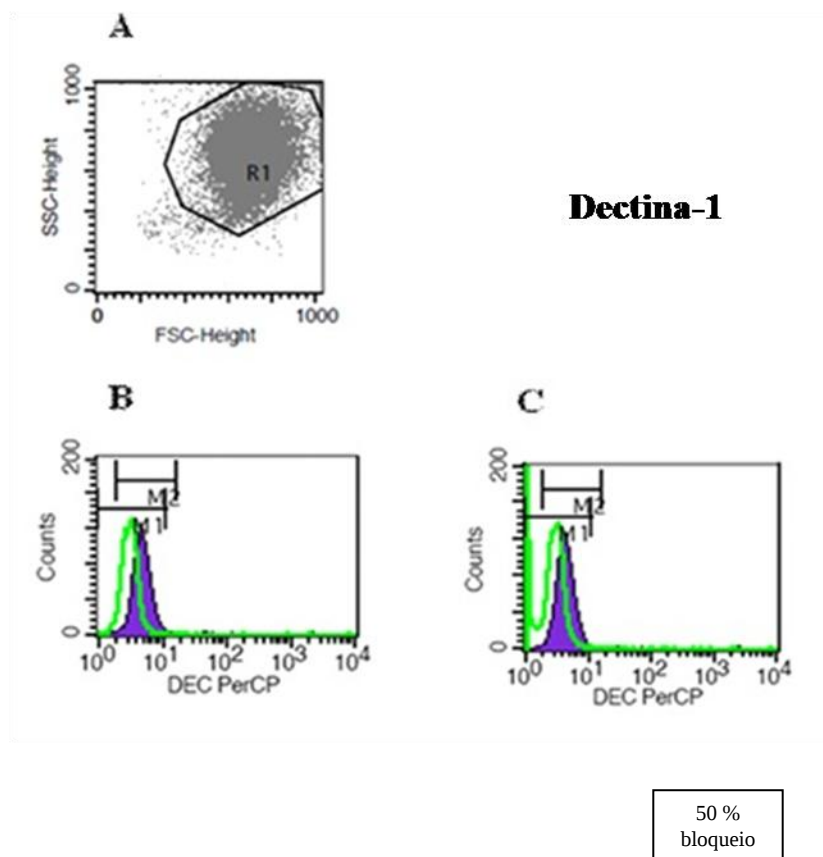


Figura 5. “Dot-plot” e histogramas representativos Avaliação da expressão e bloqueio de Dectina-1 com anticorpo monoclonal em cultura de PMNs humanos ($1 \times 10^6/\text{mL}$). Após a aquisição foi gerado um gráfico de “dot-plot” (A) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (R1). (B) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e controle positivo (roxo) e (C) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de bloqueio (roxo). Abaixo do histograma (C) está a porcentagem de bloqueio alcançada com os anticorpos monoclonais. Representativo de $n = 4$ indivíduos.

Figura 6.

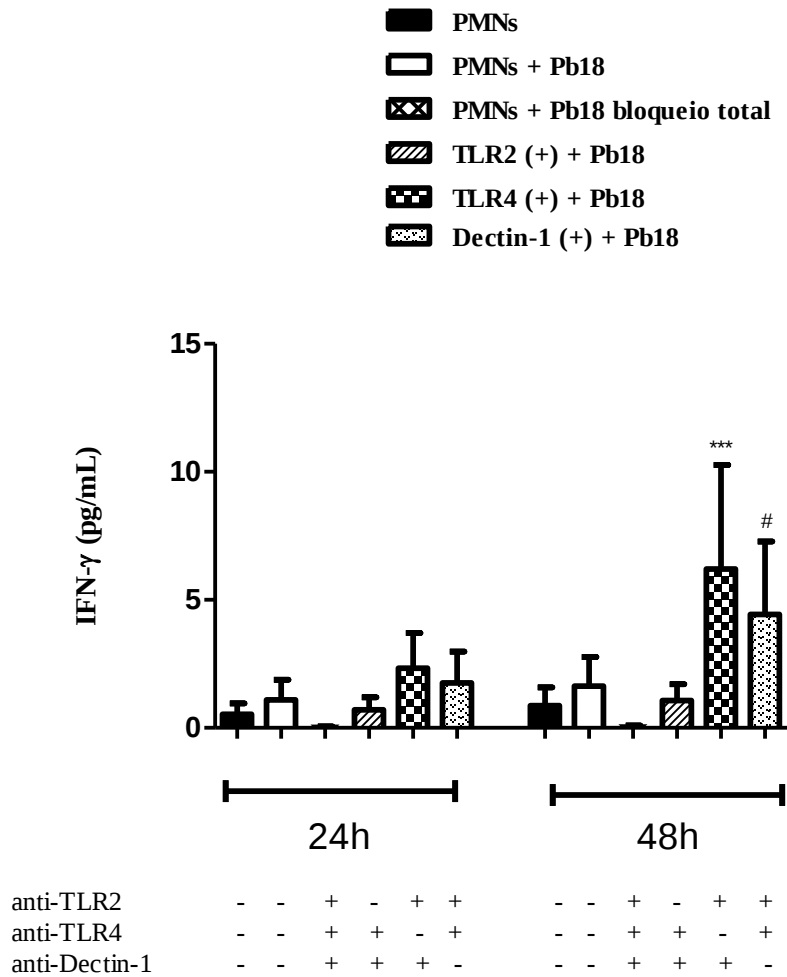


Figura 6. Participação dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 na produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao *P. brasiliensis*. Células (1×10^6 /mL) foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 e ou anti-TLR4 e ou anti-dectina-1 desafiadas ou não com Pb18 (2×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) (PMNs + Pb18 = controle) por 24 e 48 horas e avaliadas quanto à produção de IFN- γ pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 7 indivíduos). * $p < 0.001$; # $p < 0.05$ x PMNs + Pb18.

6.3. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos ativados com IL-12, IL-15 e IL-18

Uma vez determinado que PMNs humanos não ativados produzem IFN- γ em resposta ao fungo, nosso passo seguinte foi avaliar se as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 têm capacidade de modular a produção de IFN- γ . No entanto, antes de realizarmos os experimentos de ativação e desafio com o fungo, tivemos necessidade de avaliar quais as melhores doses das 3 citocinas que modulariam essa produção nos diferentes períodos.

A figura 7 mostra os resultados referentes à ativação com IL-12. Podemos observar que PMNs incubados somente com MCCC (controle) produziram níveis muito baixos de IFN- γ . Após a incubação com as diferentes doses de IL-12, houve um aumento nos níveis, que atingiram valores estatisticamente diferentes em relação às células controles nas doses de 20 e principalmente 10ng/mL. Os valores máximos de produção foram obtidos com 10ng/mL e detectados nos períodos de 24 e 48 horas, estabelecendo uma clara relação dose/efeito da IL-12. Um perfil semelhante de resposta foi observado com a IL-15 (Figura 8), com a qual houve um pequeno aumento nos níveis de IFN- γ nos períodos de 2, 4 e 12 horas. No entanto, aumento estatisticamente significativo foi detectado com as doses de 50 e 100ng/mL, nos períodos de 24 e 48 horas. Em relação à IL-18 (Figura 9), também detectamos um perfil de dose resposta, com as doses de 50 e 100ng/mL induzindo a produção de maiores níveis de IFN- γ que foram significativos também nos períodos de 24 e 48 horas. Apesar de termos detectado uma clara modulação da produção de IFN- γ pelas três citocinas testadas, os níveis dessa citocina foram relativamente baixos em todos os ensaios.

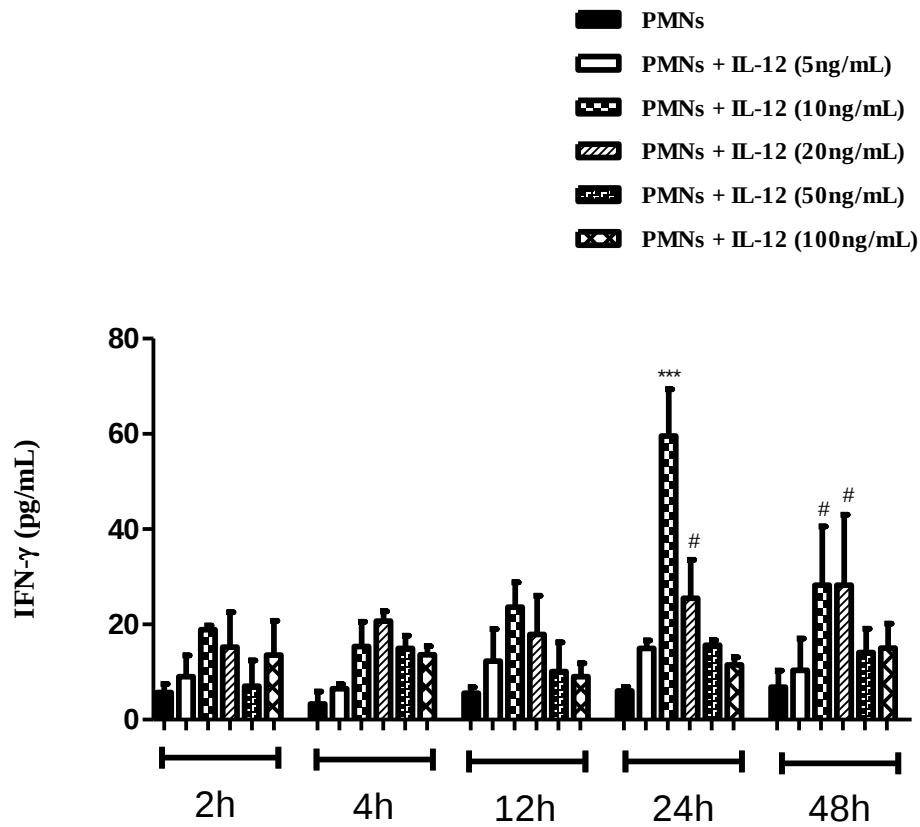
Figura 7.

Figura 7. Efeito da IL-12 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos. Células (2×10^6 /mL) foram tratadas somente com MCCC (PMNs = controle) ou IL-12 (5, 10, 20, 50 e 100ng/mL) por 2, 4, 12, 24 e 48 horas e avaliadas quanto à produção de IFN- γ pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos). * $p < 0.001$; # $p < 0.05$ x respectivo controle.

Figura 8.

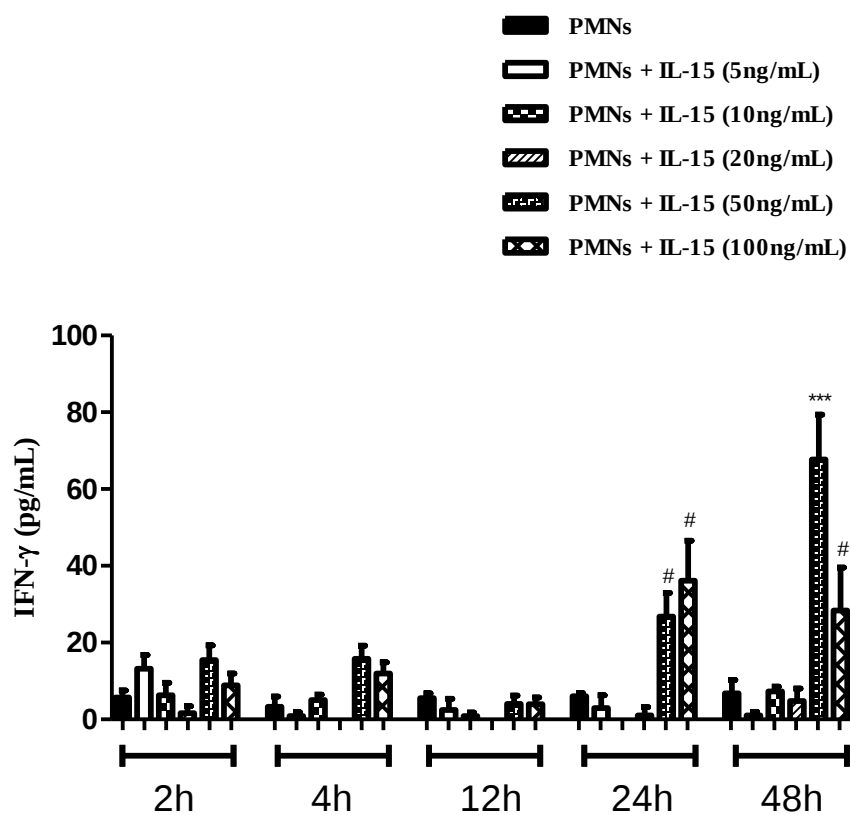


Figura 8. Efeito da IL-15 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos. Células (2×10^6 /mL) foram tratadas somente com MCCC (PMNs = controle) ou IL-15 (5, 10, 20, 50 e 100ng/mL) por 2, 4, 12, 24 e 48 horas e avaliadas quanto à produção de IFN- γ pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos). * p< 0.0001; # p< 0.05 x respectivo controle.

Figura 9.

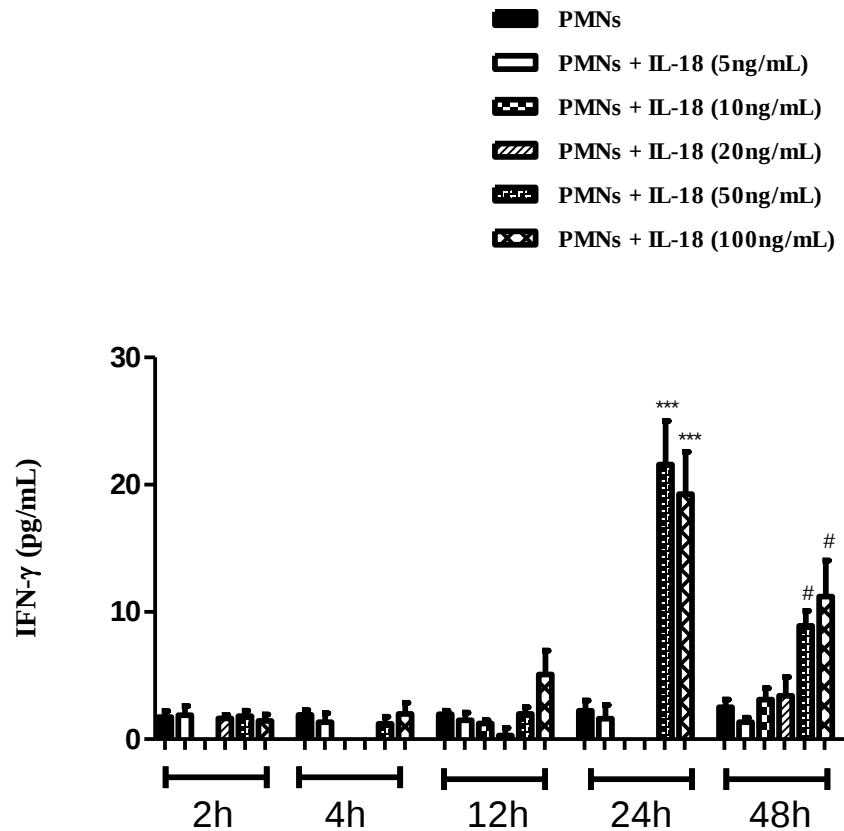


Figura 9. Efeito da IL-18 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos. Células (2×10^6 /mL) foram tratadas somente com MCCC (PMNs = controle) ou IL-18 (5, 10, 20, 50 e 100ng/mL) por 2, 4, 12, 24 e 48 horas e avaliadas quanto à produção de IFN- γ pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos). * $p < 0.001$; # $p < 0.05$ x respectivo controle.

6.4. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos ativados com IL-12, IL-15 e IL-18 e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*

Após os resultados de padronização mostrados anteriormente, verificamos se culturas de PMNs tratadas com IL-12 (10 e 20ng/mL) ou IL-15 (50 e 100ng/mL) ou IL-18 (50 e 100ng/mL) e desafiadas com a Pb18 (relação fungo/PMN 1:50) durante 24 e 48 horas apresentam aumento na produção de IFN- γ . As células desafiadas com a Pb18 liberaram quantidades significativas da citocina que aumentam significativamente quando as células são ativadas com IL-12 na concentração de 10ng/mL no período de 24h e na de 20ng/mL no período de 48h. Com relação a IL-15, detectamos um pequeno aumento na produção da citocina com a utilização das duas concentrações e nos dois períodos, não havendo diferenças estatisticamente significativas. Com relação a IL-18, um aumento significativo foi detectado com a concentração de 100ng/mL no período de 24h.

Figura 10.

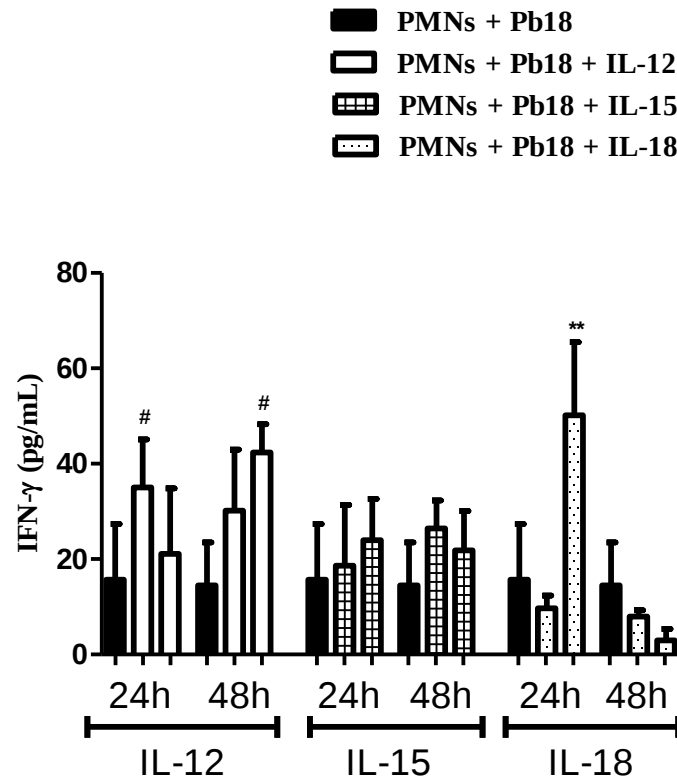


Figura 10. Efeito da IL-12, IL-15 e IL-18 sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao *P. brasiliensis*. Células (2×10^6 /mL) não ativadas e desafiadas com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (4×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) (PMNs + Pb18 = controle) ou ativadas com IL-12 (10 e 20ng/mL) ou IL-15 (50 e 100ng/mL) ou IL-18 (50 e 100ng/mL) e desafiadas com Pb18 (4×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) por 24 e 48 horas foram avaliadas quanto à produção de IFN- γ pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos). * $p < 0.05$ x PMNs + Pb18 no respectivo período; # $p < 0,05$ x PMNs + Pb18 no respectivo período.

6.5. Avaliação da produção de IFN- γ por PMNs humanos tratados com combinações da citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*

Após detecção de que a ativação das células com cada uma das citocinas isoladamente resulta em aumento da produção de IFN- γ , avaliamos se a ativação das células com duas das citocinas simultaneamente resultava em um efeito sinérgico sobre essa produção. As Figuras 11 (A, B e C) mostram os resultados referentes à produção de IFN- γ por culturas de PMNs tratadas com: A) IL-12 + IL-15 ou B) IL-12 + IL-18 ou C) IL-15 + IL-18 desafiadas com Pb18 (relação fungo/PMN 1:50), respectivamente. As células incubadas com IL-12 e IL-15 simultaneamente apresentaram um aumento significativo na produção de IFN- γ , assim como as incubadas com IL-12 + IL-18 ou IL-15 + IL-18, mas níveis significativamente maiores em relação aos demais conjuntos de citocinas foi detectado com a incubação das células com IL-12 (10ng/mL) + IL-15 (100ng/mL) com uma produção de aproximadamente 722 pg/2x10⁶ células. Em conjunto, os resultados mostram que a incubação das células com cada uma das citocinas em concentrações e períodos ideais resultam em um aumento significativo da produção de IFN- γ sendo que os melhores resultados foram obtidos com IL-12 e IL-18. No entanto, a incubação simultânea com duas das citocinas resulta em um aumento significativo dos níveis da citocina em relação aos detectados com cada uma delas isoladamente. A maior produção foi detectada após a incubação simultânea com IL-12 e IL-15.

Figura 11(A).

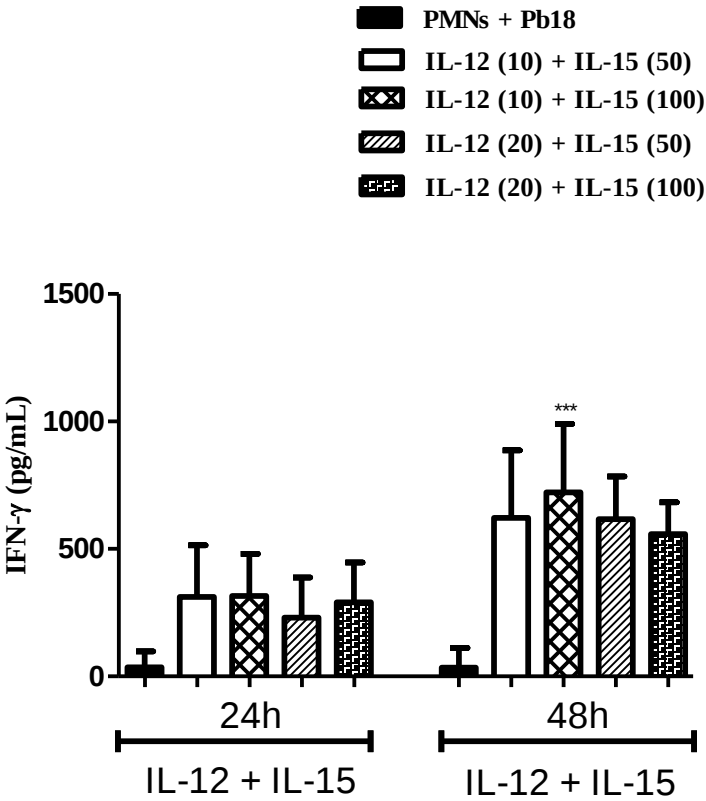


Figura 11(B).

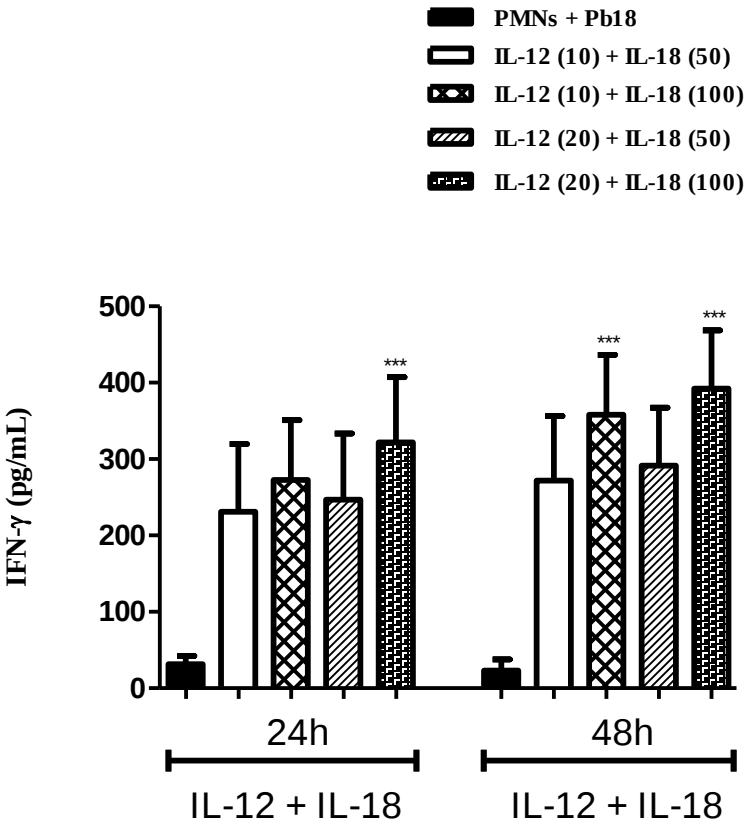
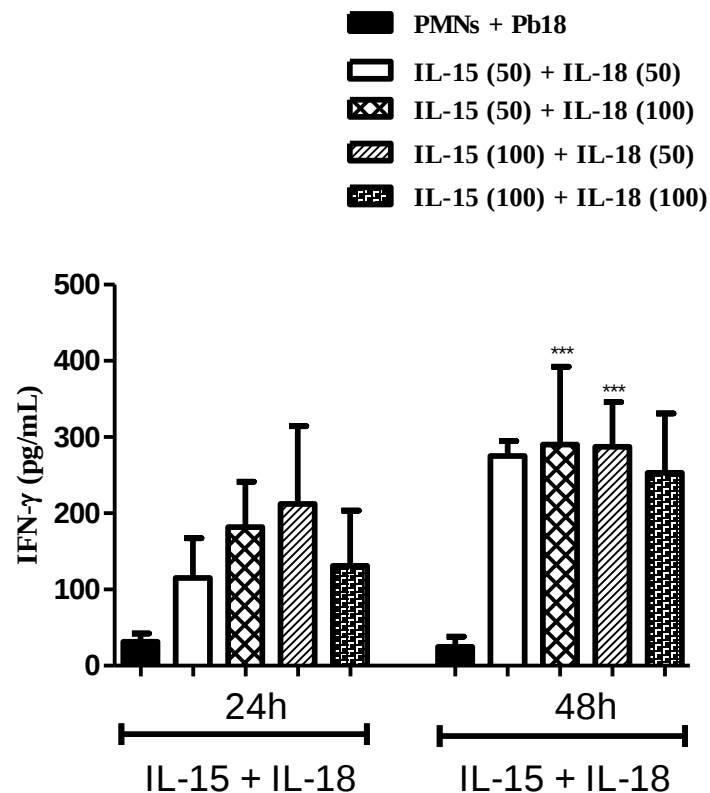


Figura 11(C).



Figuras 11 (A, B e C). Efeito dos conjuntos de duas citocinas sobre a produção de IFN- γ por PMNs humanos em resposta ao *P. brasiliensis*. Células (2×10^6 /mL) não ativados e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (4×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) (PMNs + Pb18 = controle) ou ativados com IL-12 (10 e 20ng/mL) + IL-15 (50 e 100ng/mL) **Figura (11A)** ou IL-12 (10 e 20ng/mL) + IL-18 (50 e 100ng/mL) **Figura (11B)** ou IL-15 (50 e 100ng/mL) + IL-18 (50 e 100ng/mL) **Figura (11C)** e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (4×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) por 24 e 48 horas e foram avaliadas pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos). * $p < 0.05$ x PMNs + Pb18 no respectivo período.

6.6. Expressão intracitoplasmática de IFN- γ por PMNs humanos tratados com IL-12, IL-15 e IL-18 e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* e avaliados por citometria de fluxo

Como a produção de IFN- γ pelos PMNs ainda pode ser considerado como controverso na literatura, e ainda que tenhamos trabalhado com células com mais de 90% de pureza, decidimos pela confirmação da capacidade dessas células produzirem essa citocina usando metodologia complementar ao ELISA. Escolhemos a expressão intracitoplasmática da citocina, pela técnica de citometria de fluxo. Para essa avaliação, as células foram ativadas com as combinações das três citocinas que induziram os melhores resultados no ELISA: IL-12 + IL-15 ou IL-12 + IL-18 ou IL-15 + IL-18 desafiadas ou não com Pb18 (relação fungo/PMN 1:50) por 24h. Nas figuras 12 e 13 são mostrados os resultados em porcentagem de células que expressam a citocina e os resultados da média de intensidade de fluorescência, respectivamente. Na figura 14 são mostrados os histogramas representativos desse ensaio. Observamos uma maior porcentagem de células expressando IFN- γ tanto nas combinações de IL-12 + IL-15 ou IL-12 + IL-18 ou IL-15 + IL-18. Chama a atenção, no entanto, que a incubação com IL-12 e IL-15 resulta em porcentagens maiores em relação às duas outras combinações. Esses resultados são confirmados pelos de avaliação da intensidade de fluorescência (Figuras 12 e 13), nos quais os melhores resultados foram obtidos também com IL-12 + IL-15. Estes resultados concordam com os obtidos nos ensaios de ELISA com os quais houve um aumento significativo da produção de IFN- γ após incubação das culturas de PMNs humanos com as combinações de duas citocinas, principalmente IL-12 e IL-15.

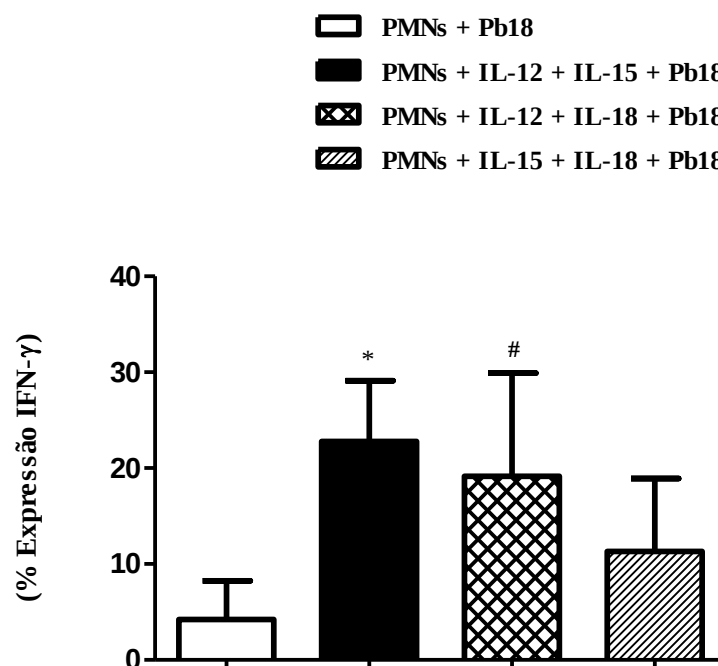
Figura 12.

Figura 12. Porcentagem de PMNs humanos que expressam IFN- γ . Células (1×10^6 /mL) foram somente desafiadas com Pb18 (2×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) (PMNs + Pb18 = controle) ou tratadas com IL-12 (10ng/mL) + IL-15 (50ng/mL) ou IL-12 (10ng/mL) + IL-18 (100ng/mL) ou IL-15 (50ng/mL) + IL-18 (100ng/mL) e desafiadas com Pb18 por 24h e avaliadas quanto a expressão intracitoplasmática de IFN- γ por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão (n = 4 indivíduos).

* $p < 0,001$ x PMNs + Pb18; # $p < 0,05$ x PMNs + Pb18.

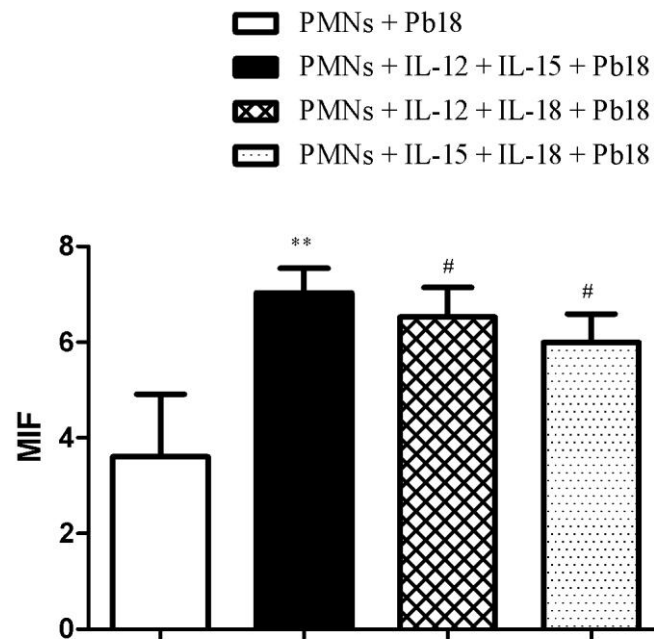
Figura 13.

Figura 13. Média de intensidade de fluorescência de PMNs humanos que expressam IFN- γ . Células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram somente desafiadas com Pb18 (2×10^4 Pb18/mL: relação fungo/PMN 1:50) (PMNs + Pb18 = controle) ou tratadas com IL-12 (10ng/mL) + IL-15 (50ng/mL) ou IL-12 (10ng/mL) + IL-18 (100ng/mL) ou IL-15 (50ng/mL) + IL-18 (100ng/mL) e desafiadas com Pb18 por 24h e avaliadas quanto a expressão intracitoplasmática de IFN- γ por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio Padrão ($n = 4$ indivíduos). * $p < 0,001$ x PMNs + Pb18; # $p < 0,05$ x PMNs + Pb18.

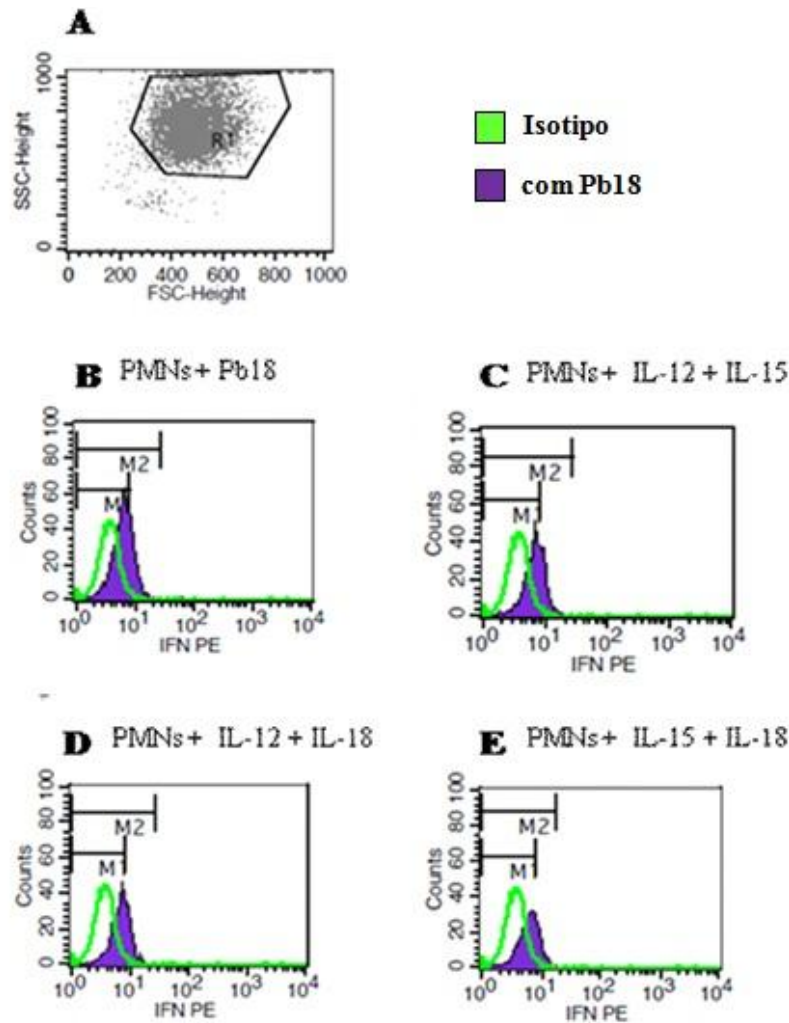
Figura 14.

Figura 14. “Dot-plot” e histogramas representativos da expressão intracitoplasmática de IFN- γ por PMNs. 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) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de expressão da amostra controle (PMNs + Pb18) (roxo), (C) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de expressão da amostra (PMNs + IL-12 + IL-15 + Pb18) (roxo), (D) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de expressão da amostra (PMNs + IL-12 + IL-18 + Pb18) (roxo) e (E) representa histograma de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotipo (verde) e índice de expressão da amostra (PMNs + IL-15 + IL-18 + Pb18) (roxo). Representativo de n = 4 indivíduos.

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 patogênicos, pelas principais células envolvidas nessa resposta, os macrófagos, monócitos e PMNs, através dos PRRs. Os estudos têm claramente mostrado que os mecanismos envolvidos nesse reconhecimento direcionarão o destino da relação fagócitos/microrganismos, no sentido de determinar se estes serão destruídos por essas células ou escaparão dos seus mecanismos efetores, se a resposta a ser modulada terá um padrão pró 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 sejam 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 PMNs e os mecanismos de modulação exercidos por essas células através da liberação de citocinas. Estudos em PMNs se tornaram 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 dos PMNs 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, Tarakhovsky *et al.*, 2012). Citocinas e quimiocinas liberadas pelos PMNs contribuem significativamente para o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios e modulam os processos inflamatórios e a resposta imune (Cassatella., 1999; Nathan *et al.*, 2006).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar se PMNs humanos desafiados com o *P. brasiliensis* produzem IFN- γ . Adicionalmente, a participação de receptores de reconhecimento de estruturas padrões como o TLR2, TLR4 e Dectina-1 e das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 sobre essa produção foi avaliada. A escolha do IFN- γ deu-se principalmente em função de responder se os PMNs podem instruir uma resposta imune adaptativa em resposta ao fungo. Vários trabalhos mostram que uma resposta adaptativa protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta Th1 envolvendo como principais citocinas o IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Arruda *et al.*, 2002; Calich *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2002). Assim a produção de IFN- γ durante a resposta imune

inata garantiria um direcionamento para esse tipo de resposta, tendo o neutrófilo como uma importante fonte dessa citocina.

Detectamos inicialmente, que PMNs humanos não ativados tem capacidade de produzir IFN- γ em resposta ao desafio com a Pb18, mesmo que em baixas concentrações. Um ponto importante da discussão é relativo à pureza da nossa cultura, uma vez que outras células como as células NK e linfócitos podem ser responsáveis pela produção de IFN- γ . Nesse sentido, primeiramente foi obtido um halo rico em células polimorfonucleares usando Histopaque de dois gradientes de densidade, em seguida a suspensão de PMNs foi purificada utilizando a metodologia de separação celular por anticorpos monoclonais anti-CD16, molécula presente na superfície destas células, acoplados a microesferas magnéticas. Adicionalmente, nossos ensaios de citometria de fluxo confirmaram que a suspensão de PMNs não apresentam marcadores típicos das células NK e linfócitos, assegurando que o IFN- γ produzido provém de PMNs.

A partir da constatação de que os PMNs eram capazes de produzir a citocina, investigamos quais PRRs estão envolvidos nesse processo. Escolhemos os receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 por estarem entre os principais envolvidos no reconhecimento fúngico. Considera-se que na dependência do receptor que serve como ligante para as várias estruturas fúngicas, vias sinalizadoras distintas podem ser desencadeadas, influenciando a resposta do hospedeiro infectado, para um padrão pró ou antiinflamatório (Romani, 2004). Os resultados mostraram que TLR4 e Dectina-1 foram os receptores que se mostraram mais envolvidos na produção de IFN- γ , uma vez que o bloqueio de TLR4 e Dectina-1 resultou em uma diminuição significativa dessa citocina. Ao contrário, quando o TLR2 ficou bloqueado houve um aumento significativo da produção da citocina, sugerindo que o TLR2 possa estar envolvido na inibição da produção da citocina. Não existem trabalhos na literatura mostrando quais PRRs estão envolvidos na produção de IFN- γ por PMNs humanos e particularmente em resposta aos fungos patogênicos.

Assim, a nossa discussão sobre o papel desses receptores levará em consideração os dados obtidos utilizando outros protocolos experimentais *in vivo* e/ou *in vitro* em estudos na paracoccidiodomicose e outras infecções fúngicas. Se considerarmos os nossos resultados isoladamente podemos sugerir que a ligação do *P. brasiliensis* tanto ao TLR4 como ao Dectina-1 resulta em mecanismos de proteção na paracoccidiodomicose e que o TLR2 poderia eventualmente estar envolvido em patogenicidade. No entanto, essa idéia deve ser analisada em função dos trabalhos existentes na literatura que mostram a complexidade dessa relação patógeno/PRR nas infecções fúngicas, incluindo a paracoccidiodomicose. Calich *et al.* (2008b), usando camundongos TLR4 deficientes e “knockout” 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 “knockout” 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 fagocíticas, que culmina com maior destruição fúngica e consequentemente 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 infectados com *P. brasiliensis*, DCs 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 à infecção. E ainda, em relação às moléculas MyD88, resultados diferentes foram detectados por González *et al.* (2008), uma vez que camundongos MyD88 apresentaram a mesma carga fúngica, assim como produção similar de citocinas próinflamatórias, levando à conclusão de que essa molécula não é essencial para o envio dos sinais celulares que culminam em, maior destruição fúngica e proteção contra a infecção.

Netea *et al.* (2002), demonstraram que o efeito 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. 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 grave associada com resposta pro/inflamatória induzida por Th17 e associada à diminuição de células Treguladoras (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 PMNs de indivíduos saudáveis após estimulação de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, e sugeriram a participação de ambos os receptores no reconhecimento, internalização e consequente ativação da resposta imune contra o fungo. 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 dessa citocina aumentar a expressão de MR. Após a ligação do fungo a esses receptores, seriam emitidos sinais de desativação importantes que culminariam com o crescimento do fungo (Dias-Melicio *et al.*, 2011).

Especificamente em relação aos PMNs, estudos prévios sugerem que a interação do fungo com os receptores TLR2 e TLR4 em PMNs humanos 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 a consequente produção de citocinas pró e antiinflamatórias por monócitos humanos.

O TLR2 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 & 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 utilizado por alguns patógenos como possível mecanismo de escape (Netea *et al.*, 2006; Pathak *et al.*, 2007)

Em relação ao receptor Dectina-1, estudos com agonistas têm demonstrado as suas várias capacidades funcionais, mas ainda é incerto como todas essas funções cabem nas respostas antifúngicas. Adicionalmente, Dectina-1 parece desempenhar um papel diferente com diferentes espécies de fungos (Drummond *et al.*, 2011). Em relação especificamente ao papel na modulação de uma resposta adaptativa, a ligação de β -glucana a células dendríticas via esse receptor, resultou na diferenciação de células TCD4 Th1 e Th17 tanto *in vitro* e *in vivo* (Leibundgut-Landmann *et al.* 2007). Estudo realizado com PMNs em resposta ao fungo *Aspergillus fumigatus*, mostraram que esse receptor está envolvido na produção de IL-17 por essas células, mostrando o papel desse receptor na indução de uma resposta adaptativa por PMNs (Werner *et al.*, 2009).

Os estudos sobre o papel do dectina-1 na paracoccidioidomicose são bastante escassos. Entre eles, um estudo mostra que a diferenciação de DCs regulatórias que secretam altas concentrações de IL-10 e baixas de IL-12 ocorre via ativação de TLR2, mas também de Dectina-1, mostrando que a ligação do fungo a esse receptor em DCs pode resultar na indução de uma resposta adaptativa não protetora (Ferreira *et al.*, 2007). Os nossos resultados, com relação ao receptor Dectina-1 mostram ao contrário, que a ligação do fungo ao receptor Dectina-1 em PMNs, pode levar ao direcionamento de uma resposta adaptativa protetora, através da produção de IFN- γ .

Os trabalhos citados acima deixam 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. Adicionalmente, 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. Um exemplo a ser destacado é o TLR4. A

ligação do fungo a esse receptor em PMNs pode levar tanto a produção de IFN- γ como detectado no presente estudo, como a produção de IL-10 detectado em estudo anterior (Acorci-Valério *et al.*, 2010).

Acreditamos que na dependência da cepa que está entrando em contato com esse receptor, envolvendo concentrações diferentes dos PAMPs, pode haver favorecimento na produção de uma ou outra citocina resultando em um ou outro processo de modulação. Assim, 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) avaliou se o dimorfismo do *P. brasiliensis* seria 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.

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 TLR2 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 Coreia foi associado à forma mais grave da hanseníase (forma lepromatosa) e relacionado à produção aumentada de IL-10 e diminuída de IL-12 (Kang & Chae, 2001; Kang *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004).

A liberação de vários mediadores pelas células fagocitárias em resposta aos microrganismos, incluindo citocinas como o IFN- γ , pode ser modulada por diversos fatores, incluindo outras citocinas liberadas pelas próprias células ou outras presentes (Antachopoulos & Roilides, 2005; Brown, 2011; Mencacci *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2005). Nesse sentido, vários trabalhos têm demonstrado que as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 de forma isolada ou atuando sinergicamente são extremamente importantes para a ativação de células da resposta imune inata, para que as mesmas desempenhem suas funções, que incluem as atividades microbicidas e a modulação da resposta imune adaptativa através da liberação de citocinas como o IFN- γ . Tradicionalmente, as células alvo dessas citocinas durante a resposta imune inata são as células NK.

A IL-12, IL-15 e IL-18 produzidas por macrófagos e DCs infectadas, atuam em sinergismo ativando células NK que aumentam a sua atividade citotóxica, e liberam IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, citocinas ativadoras de monócitos e macrófagos. Em sinergismo com IL-12, a IL-18 promove resposta antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* induzindo a produção do IFN- γ por células NK e produção de NO por macrófagos (Kawakami *et al.*, 1997; Qureshi *et al.*, 1999). A IL-12 tem importante papel imunorregulatório promovendo a imunidade mediada por células através da indução da produção de IFN- γ (Gately *et al.*, 1998). Fehniger *et al.*, 2000, demonstraram que o sinergismo da IL-12 e IL-15 induziu células NK murinas a liberarem IFN- γ . Esse processo de ativação pode ocorrer também via liberação de IFN- γ por células NKT e NKT $\gamma\delta$ estimuladas por IL-15 (Waldmann *et al.*, 1999; Yoshikai *et al.*, 2000).

Na paracoccidiodomicose estudos recentes mostraram que células NK podem participar ativamente da resposta contra o fungo, destruindo as leveduras via liberação de granulisina, ou reconhecendo e destruindo células infectadas pelo fungo. Essa atividade pode ser aumentada pela incubação com IL-15. Além dessa atividade efetora direta, essas células podem ter um importante efeito modulador, uma vez que, são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α em resposta a IL-15 (Longhi *et al.*, 2012). No presente estudo hipotetizamos que em adição a atuação sobre as células NK, as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 poderiam modular a capacidade dos PMNs produzirem IFN- γ .

Nesse sentido, realizamos ensaios nos quais PMNs foram incubados com cada uma das citocinas, assim como com combinações de duas das citocinas simultaneamente ao desafio com o fungo. As células desafiadas com a cepa Pb18 liberaram quantidades significativas da citocina que aumentam significativamente quando as células são ativadas com IL-12. Com relação à IL-15 e IL-18 detectamos um pequeno aumento na produção da citocina, não havendo diferenças importantes em relação às diferentes concentrações e períodos. No entanto, os resultados com as células ativadas com duas das citocinas simultaneamente e desafiadas com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*, mostraram que as células incubadas com IL-12 e IL-15 simultaneamente apresentaram um aumento significativo na produção de IFN- γ , assim como as incubadas com IL-12 e IL-18 ou IL-15 e IL-18, mas níveis significativamente maiores em relação aos demais conjuntos de citocinas foram detectados com a incubação das células com IL-12 e IL-15. Em conjunto, os resultados mostram que a incubação das células com cada uma das citocinas em concentrações e períodos ideais resultam em um aumento significativo da produção de IFN- γ , sendo que os melhores resultados foram obtidos com IL-12 e IL-18. A incubação simultânea com duas das citocinas resulta em um aumento ainda mais significativo dos níveis da citocina em relação aos detectados com cada uma delas isoladamente. A maior produção foi detectada após a incubação simultânea com IL-12 e IL-15. Em concordância com nossos resultados, Ethuin *et al.* (2004a), demonstraram que PMNs

humanos podem conter um pequeno estoque de IFN- γ , mas que estas células podem também sintetizar e liberar IFN- γ em resposta ao LPS após estimulação com IL-12 em combinação com a IL-2, IL-15 e IL-18 e que a combinação de IL-12 + IL-15 parece ser a mais eficiente.

Um aspecto importante a ser discutido diz respeito aos níveis de IFN- γ que foram relativamente baixos mesmo após a ativação com citocinas, em comparação aos detectados em outras populações celulares. No entanto, essas células são tão abundantes em sítios inflamatórios, que podemos considerar que a sua contribuição para os níveis totais de citocina torna-se bastante significativo (Amulic *et al.*, 2012).

Em conjunto, os resultados mostraram que provavelmente via ligação ao TLR4 e Dectina-1, o *P.brasiliensis* induz PMNs humanos a produzirem IFN- γ e que essa produção é modulada positivamente por citocinas, particularmente a IL-12 + IL-15. Esses resultados encontram suporte em estudos realizados em outras infecções. Nesse sentido, Yin & Ferguson (2009), demonstraram que o IFN- γ desempenha um papel crucial durante a resposta imune na infecção por *Listeria monocytogenes* e que no início da resposta imune inata além das células NK, os PMNs são fontes iniciais de IFN- γ . Em outro estudo, o fenômeno foi observado na infecção murina por *Nocardia asteroides* após três dias de infecção, quando grande quantidade de PMNs estava presente (Ellis & Beaman, 2002).

Embora os nossos objetivos tenham sido dirigidos para o papel modulador dos PMNs no que se refere ao direcionamento de uma resposta Th1, convém discutir que o fato dos PMNs produzirem IFN- γ pode ter implicações importantes sobre a modulação da própria resposta imune inata, uma vez que, o IFN- γ liberado pode regular as funções antifúngicas dos próprios PMNs e de outros tipos celulares como os macrófagos, tal como o *burst* oxidativo, migração, apoptose e produção de outras citocinas ativadoras como o TNF- α (Cassatella, 1999; Ellis, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Esse mecanismo é especialmente importante na paracoccidioidomicose, visto que já foi evidenciada a participação dessas citocinas na ativação de monócitos e macrófagos murinos e humanos para que essas células adquiram atividade fungicida contra o fungo (Brummer *et al.*, 1988a e b, 1989; Calvi *et al.*, 2003a e b; Cano *et al.*, 1992a e b; Cano *et al.*, 1998; Carmo *et al.*, 2006; González *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2008; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Souto *et al.*, 2000).

Além da modulação das atividades das células fagocitárias, trabalhos mais recentes mostraram que *in vitro*, PMNs são capazes de modular a sobrevivência das células NK, proliferação, atividade citotóxica e produção de IFN- γ e esta produção de IFN- γ pelas células NK pode ser mediada por ICAM3 expressa na superfície de PMNs, ou por meio da geração de ROI e prostaglandinas e/ou por liberação dos componentes granulares. Também foi demonstrado que PMNs *in vitro* promovem liberação de IL-12p70 por DCs via interação com ICAM1 e esta IL-

12p70 estimula células NK a produzirem IFN- γ (Costantini *et al.*, 2011a; Costantini *et al.*, 2011b; Costantini & Cassatella, 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a nossa hipótese de que durante a infecção pelo *P.brasiliensis*, os PMNs podem instruir a resposta imune adaptativa para um padrão de resposta Th1, através da produção de IFN- γ . Trinchieri *et al.*, 1995 & Wysocka *et al.*, 1995, estudando os mecanismos de desenvolvimento de uma resposta Th1 mostraram que a síntese inicial de IFN- γ pode ser necessária para a geração de IL-12, que por sua vez é essencial para primar células efectoras Th1 (Ariel *et al.*, 2002; Ethuin *et al.*, 2001; Fehniger *et al.*, 2000; Munder *et al.*, 1998; Woerly *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 1997).

Em conjunto a literatura mostra cada vez mais a existência de uma capacidade de regulação autócrina e parácrina dos PMNs durante o desenvolvimento de uma infecção reforçando a ideia de que PMNs podem desempenhar um papel ativo na modulação do sistema imune. Dado que PMNs são muitas vezes as primeiras células a responder a uma infecção, a capacidade de comunicar com outros tipos de células pode ser crítica no fornecimento de sinais vitais para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente (Ellis & Beaman, 2002). Dentro deste contexto, o nosso trabalho contribui no sentido de que todo esse processo imunomodulatório via PMNs pode estar ocorrendo durante a evolução da paracoccidioidomicose. Trabalhos devem ser dirigidos para um melhor conhecimento desse processo, no sentido de favorecer os mecanismos de proteção do hospedeiro.

8. Considerações Finais

1. O fungo *P.brasiliensis* induz a produção de IFN- γ por PMNs humanos.
2. Esse processo ocorre via ligação do fungo aos receptores TLR4 e Dectina-1 nessas células.
3. A produção de IFN- γ pode ser aumentada pela ativação das células com IL-12, IL-15 ou IL-18 de uma forma isolada ou por combinações de duas dessas citocinas, sendo a formada por IL-12 mais IL-15, a mais eficaz.

9. Referências Bibliográficas

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

Amulic B.; Cazalet C.; Hayes G.L.; Metzler K.D.; Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu Rev Immunol. 2012; (30):459-89.

Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004; 4(7):499-511.

Antachopoulos C.; Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Haematol. 2005; 129(5):583-96. Review.

Ariel A.; Novick D.; Rubinstein M.; *et al.* IL-12 and IL-18 induce MAP kinase-dependent adhesion of T cells to extracellular matrix components. J Leukoc Biol. 2002; (72):192-198.

Arruda C.; Franco M.F.; Kashino S.S.; Nascimento F.R.; Fazioli R.A.; Vaz C.A., *et al.* IL-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. Clin Immunol. 2002; 185-195.

Bannwart C.F.; Martins R.A.; Nakaira-Takahashi E.; Dias-Melicio L.A.; Soares A.M.V.C.; Peraçoli M.T.S. Interleukin-15 augments oxidative metabolism and fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(7):866-72.

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

Bonfim C.V.; Mamoni R.L.; Blotta M.H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol 2009; (47):722-33.

Brinkmann V. U.; Reichard C.; Goosmann B.; Fauler Y.; Uhlemann D. S.; Weiss Y.; Weinrauch and A. Zychlinsky. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; (303):1532-1535.

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

Brummer E.; Hanson L.H.; Restrepo A.; Stevens D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. J Immunol. 1988a; Apr 15; 140(8):2786-9.

Brummer E.; Hanson L.H.; Stevens D.A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. Int J Immunopharmacol. 1988b; 10(8):945-52.

Brummer E.; Hanson L.H.; Restrepo A.; Stevens D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. Infect Immun. 1989; (57):2289-94.

Calich V.L.; Kipnis T.L.; Mariano M.; Neto C.F.; Dias da Silva W.D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection Clin Immunol Immunopathol. 1979; Jan 12(1):21-30.

Calich V.L.; Coppi Vaz C.A.; Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol. 1985a; 66(1):57-65.

Calich V. L. G.; Singer-Vermes L. M.; Siqueira A. M.; Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol. 1985b; (66):585.

Calich V.L.G.; Russo M.; Vaz C.A.C.; Burger E.; Singer-Vermes L.M. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Cienc Cult. 1994; (46):455-61.

Calich V.L.G. & Kashino S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz J Med Biol Res. 1998; 31(5):615-23.

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

Calich V.L.; Pina A.; Felonato M.; Bernardino S.; Costa T.A.; Loures F.V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008b; (53) 1-7.

Calvi S.A.; Peraçoli M.T.S.; Mendes R.P.; Marcondes-Machado J.; Fecchio D.; Marques S.A., *et al.* Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect. 2003a; (5):107-13.

Calvi S.A.; Soares A.M.V.C.; Peraçoli M.T.; Franco M.; Ruiz R.L. Jr.; Marcondes-Machado J.; Fecchio D.; Mattos M.C.; Mendes R.P. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. *Microbes Infect.* 2003b; Dec 5(15):1373-9.

Cano L.E.; Brummer E.; Stevens D.A.; Restrepo A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect Immun.* 1992a; 60(5): 2096-100.

Cano L.E.; Arango R.; Salazar M.E.; Brummer E.; Stevens D.; Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol.* 1992b; 30(2):161-8.

Cano L.E.; Kashino S.S.; Arruda C.; André D.; Xidieh C.F.; Singer-Vermes L.M.; Vaz C.A.; Burger E.; Calich V.L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1998; 66(2):800-6.

Carmo J.P.; Dias-Melicio L.A.; Calvi S.A.; Peraçoli M.T.S.; Soares A.M.V.C. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006; (44):363-8.

Cassatella M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 1999; (73):369-509.

Colotta F.; Re F.; Polentarutti N.; Sozzani S. & Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992; (80):2012-2020.

Costa D.L.; Dias-Melicio L.A.; Acorci M.J.; Bordon A.P.; Tavian E.G.; Peraçoli M.T.; Soares A.M.V.C. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(1):73-80.

Costantini C. & Cassatella M. A. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2011; (89):221-233.

Costantini C. *et al.* Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood.* 2011a; (117):1677-1686.

Costantini C.; Micheletti A.; Calzetti F.; Perbellini O.; Tamassia N.; Albanesi C.; Vermi W.; Cassatella M.A. On the potential involvement of CD11d in co-stimulating the production of interferon- γ by natural killer cells upon interaction with neutrophils via intercellular adhesion molecule-3. *Haematologica.* 2011b; 96(10):1543-7.

Dias-Melicio L.A.; Fernandes R.K.; Golim M.A.; Rodrigues D.R.; Soares A.M.V.C. Interleukin 18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. *Inflammation Research. Official Journal of The International Association of Inflammation Societies.* 2011; (60):S167.

Drummond R.A.; Saijo S.; Iwakura Y.; Brown G.D. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol.* 2011; (41):276-281.

Ellis T.N.; Beaman B.L. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon- γ in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol.* 2002; (72):373-381.

Ellis T.N.; Beaman B.L. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil functions. *Immunology*. 2004; (112):2-12.

Ethuin F.; Delarche C.; Benslama S., *et al.* Interleukin-12 increases interleukin-8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001; (70):439-446.

Ethuin F.; Gerard B.; Bemma J.E.; Boutten A.; Gougereot M.A.; Jacob L.; Chollet-Martin S. Human neutrophil produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory Investigation*. 2004a; (84):363-1371.

Fehniger T.A.; Yu H.; Cooper M.A.; *et al.* Cutting Edge: IL-15 costimulates the generalized Schwartzman reaction and innate immune IFN γ production in vivo. *J Immunol*. 2000; (164):1643-1647.

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

Franco M.; Montenegro M.R.G. Anatomia Patológica. In: Del Negro G, Lacaz C.S.; Fiorillo A.M. *Paracoccidioidomycose*. Sarvier-EDUSP. 1982; 97-117.

Franco M.; Montenegro M.R.; Mendes R.P.; Marques S.A.; Dillon N.L.; Mota N.G. *Paracoccidioidomycosis*: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987; Apr-Jun 20(2):129-32.

Franco M., Mendes R.P.; Moscardi-Bacchi M.; Rezkallah-Iwasso M.T.; Montenegro M.R. *Paracoccidioidomycosis*. *Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis*. 1989; (4):185-220.

Franco M.; Peraçoli M.T.S.; Soares A.M.V.C.; Montenegro M.R.; Mendes R.P.; Meira D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993; (5):115-49.

Galli S.J.; Borregaard N. & Wynn T.A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunol*. 2011; (12):1035-1044.

Gately M.K.; Renzetti L.M.; Magram J.; Stern A.S.; Adorini L.; Gluber U.; Presky D.H. The interleukin-12/interleukin-12 receptor system; role in normal and pathogenic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; (16):495-521.

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

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

Iabuki K.; Montenegro M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of the lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia* 1979; (67):131-41.

Jaillon S.; Galdiero M.R.; Del Prete D.; Cassatella M.A.; Garlanda C.; Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*. 2013; 35(4):377-94.

Kang T.J.; Chae G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001; 31(1):53-8.

Kang T.J.; Lee S.B.; Chae G.T. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine.* 2002; 20(2):56-62.

Kang T.J.; Yeum C.E.; Kim B.C.; You E.Y.; Chae G.T. 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.

Kawakami K.; Qureshi M.H.; Zhang T.; Okamura H.; Kurimoto M.; Saito A. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN-gamma production. *J Immunol.* 1997; (159):5528-5534.

Kerr I.B.; Araripe P.C.O.; Lenzi H.L. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. *Ver Inst Med Trop. - São Paulo* 1988; (30):336-50.

Kevin M. Rigby & Frank R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *DeLeo Semin Immunopathol.* 2011; 34:3.

Kurita N.; Oarada M.; Ito E.; Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999; (37):261-67.

Kurita N.; Oarada M.; Miyaji M.; Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000; 38(2):177-82.

Kurita N.; Oarada M.; Brummer E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. Med Mycol. 2005; 43(5):417-22.

Kurokawa C.S.; Araujo J.P. Jr.; Soares A.M.V.C.; Sugizaki M.F.; Peraçoli M.T.S. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiol Immunol. 2007; 51(4):421-8.

Leibundgut-Landmann S.; Gross O.; Robinson M.J.; Osorio F.; Slack E.C.; Tsoni S.V.; Schweighoffer E.; Tybulewicz V.; Brown G.D.; Ruland J., *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):630-638. This study demonstrates for the first time that Dectin-1-mediated signaling can trigger adaptive immune responses independent of the TLRs.

Loose D.S.; Stover E.P.; Restrepo A.; Stevens D.A.; Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1983; (80):7659-63.

Longhi L.N.; da Silva R.M.; Fornazim M.C.; Spago M.C.; de Oliveira R.T.; Nowill A.E.; Blotta M.H.; Mamoni R.L. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J Immunol. 2012; 189(2):935-45.

Loures F. V.; A. Pina.; M. Felonato and V. L. G. Calich. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2009; (183):1279-1290.

Loures F.V.; Pina A.; Felonato M.; Araújo E.F.; Leite K.R.; Calich V.L. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun.* 2010; 78(3): 1078-88.

McEwen J.G.; Brummer E.; Stevens D.A.; Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; (36): 603-8.

Mantovani, A.; Cassatella M.A.; Costantini C.; Jailon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptative immunity. *Nature Reviews Immunol.* 2011; (11):519-531.

Meloni-Bruneri L.H.; Campa A.; Abdalla D.S.; Calich V.L.; Lenz H.L.; Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. *J Leukoc Biol.* 1996; (59):526-33.

Mencacci A.; Cenci E.; Bacci A.; Montagnoli C.; Bistoni F.; Romani L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2000; 1(3): 235-51.

Mendes R.P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M.; Lacaz C.S.; Restrepo-Moreno A.; Del Negro G. (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton. CRC Press. 1994; 233-58.

Moreira A.P.; Dias-Melicio L.A.; Peraçoli M.T.; Calvi S.A.; Victoriano de Campos Soares A.M. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia.* 2008; 166(1): 17-23.

Moreira A.P.; Dias-Melicio L.A.; Soares A.M.V.C. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. *Cell Immunol.* 2010; 263(2):196-203.

Moscardi-Bacchi M.; Brummer E.; Stevens D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol.* 1994; (40):159-64.

Munder M.; Mallo M.; Eichmann K. and Modolell M. Murine Macrophages Secrete Interferon- γ upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation *J Exp Med.* 1998; 187(12): 2103-2108.

Munk M.E.; Da Silva W.D. Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30(6):481-4.

Nakaira-Takahagi E.; Golim M.A.; Bannwart C.F.; Puccia R.; Peraçoli M.T.S. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med Microbiol Immunol.* 2010; 49(7):694-703.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Review. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3):173-82.

Netea M.G.; Van Der Graaf C.A.; Vonk A.G.; Verschueren I.; Van Der Meer J.W.; Kulberg B.J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 2002; (185):1483-9.

Netea M.G.; Gow N.A.; Munro C.A.; 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.

Nicola A.M.; Casadevall A.; Goldman D.L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Mycobiol.* 2008; 11(4):313-7.

Oliveira S.J.; Mamoni R.L.; Musatti C.C.; Papaiordanou P.M.; Blotta M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; (2):139-44.

Ogus A.C.; Yoldas B.; Ozdemir T.; Uguz A.; Olcen S.; Keser I.; Coskun M.; Cilli A.; Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J.* 2004; (2):219-23.

Pathak S.K.; Basu S.; Basu K.K.; Banerjee A.; Pathak S.; Bhattacharyya A.; Kaisho.; Kundu M.; Basu J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol.* 2007; 8(6):610-8.

Pina A.; Saldiva P.H.; Restrepo L.E.; Calich V.L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol.* 2006; (79):1202-13.

Popi A.F.; Lopes J.D.; Mariano M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 2002; (218): 87-94.

Qureshi M.H.; Zhang T.; Nakashima K.; Okamura H.; Kurimoto M.; Kawakami K. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection in *Cryptococcus neoformans*. Eur J Immunol. 1999; (29): 643-649.

Restrepo A.; Salazar M.E.; Cano L.E.; Stover E.P.; Feldman D.; Stevens D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect Immun. 1984; (46):346-53.

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

Rodrigues D.R.; Dias-Melício L.A.; Calvi S.A.; Peraçoli M.T.S.; Soares A.M.V.C. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol. 2007; 45(1):27-33.

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

Romano C.C.; Mendes-Giannini M.J.S.; Duarte A.J.S.; Benard G. IL12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. Cytokine. 2002; 18(3):149-57.

Salazar M.E.; Restrepo A.; Stevens D.A. Inhibition by estrogens to conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 1988; (56):711-3.

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

Sandilands G.P.; McCrae J.; Hill K.; Perry M.; Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on *in vitro* and *in vivo* activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*. 2006; (119):562-71.

Segal A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005; (23):197- 223.

Silva C.L.; Alves L.M.; 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.

Silva M.T. and Correia-Neves M. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers Immunol*. 2012; (3):174:1-6.

Souto J.T.; Figueiredo F.; Furlanetto A.; Pfeffer K.; Rossi M.A.; Silva J.S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*. 2000; 156(5):1811-20.

Souto J.T.; Aliberti J.C.; Campanelli A.P.; Livonesi M.C.; Maffei C.M.; Ferreira B.R.; Travassos L.R.; Martinez R.; Rossi M.A.; Silva J.S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol*. 2003; 163(2):583-90.

Scapini P.; Bazzoni F. & Cassatella M. A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett*. 2008; (116): 1-6.

Stover E.P.; Schar G.; Clemons K.V.; Stevens D.A.; Feldman D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 1986; (51):1999-203.

Tarakhovsky A.S.; Kroemer G. Innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2012; (24): 1-2.

Tavian E.G.; Dias-Melicio L.A.; Acorci M.J.; Bordon-Graciani A.P.; Peraçoli M.T.S.; Soares A.M.V.C. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine.* 2007; 41(2008):48-53.

Tofts P. S.; Chevassut T.; Cutajar M.; Dowell N. G. & Peters A. M. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2011; (117):6050-6052; author reply 6053-6054.

Toledo R.G.; Da Silva W.D.; Calich V.L.; Kipnis T.L. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Immunol.* 2010; 48(1-3):26-36.

Thomas C.J.; Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* 2013; S1471 - 4906(13):00036-7.

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995; (13):251.

Waldmann T.A.; Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 1999; (17):19-49.

Walsh T.J.; Roilides E.; Cortez K.; Kottlilil S.; Bailey J.; Lyman CA. Control, immunoregulation and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2005; 43(1):165-72.

Werner J.; *et al.* Requisite role for the Dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. J. Immunol. 2009; (182):4938-4946.

Woerly G.; Roger N.; Loiseau S.; *et al.* Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon g): inhibition by immunoglobulin A complexes. J Exp Med. 1999; (16):487-495.

Wysocka M. M.; Kubin L.; Vieira L.; Ozmen G.; Garotta P.; Scott and G. Trinchieri. Interleukin-12 is required for interferon- γ production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. Eur. J. Immunol. 1995; (25):672.

Yin J.; Ferguson T.A. Identification of an IFN-gamma-producing neutrophil early in the response to *Listeria monocytogenes*. J Immunol. 2009; 182(11):7069-73.

Yoshikai Y.; Nishimura H. The role of interleukin-15 in mounting an immune response against microbial infection. Microbes Infect. 2000; 2(4):381-9.

Yoshimoto T.; Okamura O.; Tagawa Y-I., *et al.* Interleukin-18 together with interleukin-12 inhibits IgE production by induction of interferon-g production from activated B cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; (94):3948-3957.

Zhang P.; Quilton L.J.; Bagby G.J., *et al.* Interferon-gamma enhances the pulmonary CXC chemokine response to intratracheal lipopolysaccharide challenge. J Infect Dis. 2003; (187):62-69.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de abril de 2.010

OF. 111/2010-CEP

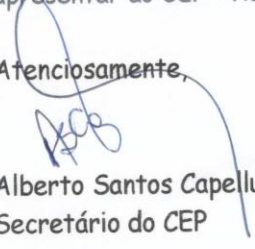
Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Departamento de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociências do Campus de Botucatu

Prezada Dr^a. Angela,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3484-2010) "Efeito das citocinas IL-15, IL-12 e IL-18 sobre as funções de neutrófilos humanos em resposta ao P.brasiliensis: atividades antifúngicas e direcionamento da resposta imune adaptativa" a ser conduzido por Daniela Ramos Rodrigues, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Ana Paula Bordon Graciani, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05 de abril de 2.010.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

