

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

**Ação da IL-18 sobre a expressão do
receptor dectina-1 e produção de citocinas por monócitos humanos
desafiados com diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis***

Muriel Borçato Cestari

Botucatu - SP

2012

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

**Ação da IL-18 sobre a expressão do
receptor dectina-1 e produção de citocinas por monócitos humanos
desafiados com diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis***

Muriel Borçato Cestari

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Alarcão Dias-Melicio

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

Botucatu - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cestari, Muriel Borçato.

Ação da IL-18 sobre a expressão do receptor dectina-1 e produção de citocinas por monócitos humanos desafiados com diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* / Muriel Borçato Cestari. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio
Capes: 21102007

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Monócitos. 3. Citometria de fluxo. 4. Células – Membranas.

Palavras-chave: IL-10; IL-18; Monócitos; *Paracoccidioides brasiliensis*; Receptor dectina-1; TNF- α .

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Moacyr e Rosana e à minha irmã, Moana, pelo amor incondicional. Sem vocês, eu nada seria, o meu muito obrigada por vocês estarem presentes, por serem os meus presentes.

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A todos do departamento de Imunologia, pelo acolhimento carinhoso.

Aos amigos que sempre estiveram junto comigo ao longo dessa caminhada e foram indispensáveis.

Aos meus companheiros de laboratório: Ana Paula, Guilherme, Helan, Dani, Tati, Régis e Juliana, que muito me ensinaram e ajudaram.

Às Imunetes: Cecília, Fabiana, Laís e Victória, que fizeram meus dias melhores.

Um agradecimento especial à Natália Prearo pela ajuda constante e pela amizade sincera.

À Professora Ângela por ter me permitido utilizar as instalações e os equipamentos de seu laboratório.

À minha orientadora, Luciane, pela atenção e pela brilhante orientação.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro imprescindível durante a realização do projeto.

Memória

Amar o perdido
deixa confundido
este coração.

Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não.

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.

Mas as coisas findas
muito mais que lindas,
essas ficarão.

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	20
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1. Casuística	21
3.2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	21
3.3. Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	21
3.4. Teste de viabilidade do <i>P. brasiliensis</i>	22
3.5. Isolamento e cultura de monócitos do sangue periférico	22
3.6. Avaliação da expressão de dectina-1 na superfície de monócitos por citometria de fluxo	23
3.7. Bloqueio da ligação do <i>P. brasiliensis</i> ao receptor dectina-1 utilizando-se anticorpo monoclonal	25
3.8. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos de indivíduos saudáveis	25
3.9. Dosagem de IL-18, TNF- α e IL-10.	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Avaliação da ação da IL-18 sobre a expressão de dectina-1 em monócitos ..	28

4.2. Avaliação da ação da IL-18 e do receptor dectina-1 sobre a produção de citocinas	30
4.2.1. Padronização da concentração ideal de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 para a determinação do bloqueio do receptor em monócitos	30
4.2.2. Produção de IL-18	33
4.2.3. Produção de TNF- α	34
4.2.4. Produção de IL-10	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

Estudos têm demonstrado que o reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Assim, a interação entre moléculas de superfície dos patógenos e receptores homólogos presentes na membrana celular de monócitos, modula a fagocitose, a ativação da célula e conseqüentemente a produção de citocinas. Trabalhos têm demonstrado a importância da estimulação de receptores toll-like 2 e 4 (TLR2 e TLR4), receptores de manose (MR) e dectina-1 de monócitos, tanto em infecções bacterianas como fúngicas, culminando com indução de produção de várias citocinas. A IL-18 é uma citocina indutora de IFN- γ e possui uma ação extremamente importante, por ser capaz de promover tanto uma resposta do tipo Th₁ ou Th₂, dependendo do contexto de estimulação e do microambiente de citocinas. Em trabalho recente demonstramos que a IL-18 possui uma ação importante sobre o aumento da expressão de MR em monócitos humanos, e o reconhecimento do *Paracoccidioides brasiliensis* via esse receptor causaria aumento do crescimento fúngico no interior da célula. Dessa forma, os objetivos do presente projeto foram: 1) Avaliar a ação da IL-18 sobre a expressão do receptor dectina-1 por monócitos humanos desafiados *in vitro* com diferentes cepas do *P. brasiliensis*; b) Avaliar a participação da dectina-1 na indução da produção de IL-18, TNF- α e IL-10 por monócitos desafiados *in vitro* com diferentes cepas do *P. brasiliensis*. Assim, monócitos de indivíduos normais tratados *in vitro* com IL-18 foram desafiados com diferentes de cepas do *P. brasiliensis*, e a expressão do receptor dectina-1 foi avaliada pela técnica de

citometria de fluxo. A dosagem de IL-18, TNF- α e IL-10 no sobrenadante de cultura de monócitos desafiados com *P. brasiliensis* foi realizada utilizando a técnica de ELISA. Os resultados mostraram que a IL-18 não afeta a expressão de dectina-1 em monócitos humanos, e induz aumento de TNF- α e IL-10 em monócitos não desafiados. Níveis mais elevados de IL-18 e IL-10 foram detectados após o desafio com a cepa virulenta (Pb 18), enquanto a cepa Pb 265 induziu uma maior expressão do receptor dectina-1 e maior produção de TNF- α por monócitos. No entanto, apenas os níveis de TNF- α induzidos pelas cepas foram diminuídos após bloqueio do receptor dectina-1, utilizando-se anticorpo monoclonal específico de bloqueio. Em conclusão, nossos resultados demonstram a ação da IL-18 na indução de TNF- α e IL-10 por monócitos não desafiados, e a participação do receptor dectina-1 no reconhecimento do *P. brasiliensis* e na consequente indução de TNF- α via receptor dectina-1.

Palavras chave: IL-10; IL-18. Monócitos; Receptor Dectina-1, *Paracoccidioides brasiliensis*, TNF- α .

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma infecção fúngica sistêmica, endêmica na América Latina, cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), um fungo imperfeito e dimórfico, que se desenvolve como levedura *in vivo*, nos tecidos do hospedeiro 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 *et al.*, 2005). Na América Latina, estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas com *P. brasiliensis*, sendo que 1 a 2% destes indivíduos desenvolvem a PCM. Especificamente, no Brasil esta micose torna-se importante por ser a infecção fúngica sistêmica mais prevalente e onde estão localizados 80% dos casos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Martinez, 2010; Colombo *et al.*, 2011).

Afeta principalmente trabalhadores rurais, que estão constantemente em contato com a vegetação e o solo. Acredita-se que os propágulos infectantes do *P. brasiliensis* sejam conídios produzidos por micélios presentes em água, plantas e solo, que penetrariam no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo os pulmões, formando o complexo primário pulmonar. Assim, a infecção se faz pela via respiratória, pela inalação de conídios, que atingem os alvéolos, estabelecendo o complexo primário, podendo o fungo aí ficar limitado ou disseminar-se por via linfo-hematogênica para outros órgãos, como fígado, baço e adrenais (Franco *et al.*, 1989). Complexos eventos inflamatórios e imunológicos são desencadeados pela interação fungo-hospedeiro, resultando na reação inflamatória granulomatosa e freqüente instalação de distúrbios imunorregulatórios. A gravidade da doença correlaciona-se com a imunodepressão e apresenta grande heterogeneidade, como

manifestado pelas diferentes formas clínicas da doença: a forma aguda ou subaguda, mais grave, afeta jovens (a maioria até 20 anos de idade) de ambos os sexos, progride rapidamente através da disseminação linfática e hematogênica do fungo para o sistema fagocítico-mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) e leva à deterioração clínica rápida do paciente. A forma crônica, a mais freqüente, progride lentamente, afetando predominantemente indivíduos adultos (principalmente acima do 40 anos) do sexo masculino, lavradores, progredindo silenciosa e lentamente, podendo levar anos até ser diagnosticada, sendo o pulmão o órgão mais frequentemente acometido. Essa forma pode manifestar-se clinicamente localizada (forma unifocal), com lesões pulmonares que geralmente evoluem para processos fibróticos; ou com o acometimento de múltiplos órgãos (forma multifocal), sendo a evolução e a gravidade bastante variáveis (Franco *et al.*, 1993; Mendes, 1994; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2011).

O estabelecimento da doença, disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como sua virulência, composição antigênica, das condições ambientais, e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, e principalmente capacidade de desenvolver resposta imune eficaz (Restrepo *et al.*, 1984; Peraçoli & Soares, 1992; Franco *et al.*, 1993). Em relação a este fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos específicos e inespecíficos de defesa na determinação da resistência ao *P. brasiliensis*. (Franco *et al.*, 1993; Calich *et al.*, 1994; Musatti *et al.*, 1994; Peraçoli *et al.*, 1995).

A imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos constituindo-se na primeira linha de defesa contra infecções, reconhecendo um largo espectro de patógenos sem necessidade de sensibilização

prévia. Além disso, a ativação da resposta imune inata desencadeia a produção de uma rede de citocinas, resultando em resposta inflamatória e podendo ser um pré-requisito para o desencadeamento da imunidade adquirida (Akira *et al.*, 2001; Kokkinopoulos *et al.*, 2005). Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência ao *P. brasiliensis*, destacando-se a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida.

O reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata. A interação entre moléculas de superfície do parasita e receptores homólogos, presentes na membrana celular de macrófagos, modula a fagocitose e a ativação da célula (Gordon *et al.*, 1988; Ohman *et al.*, 1988). Várias classes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), reconhecem os vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), contudo há um interesse maior nos receptores semelhantes a toll (TLR, *Toll-like receptor*) e uma família de lectinas do tipo-C (CLRs), os quais parecem ter papel central na imunidade antifúngica (Willment & Brown, 2008). Portanto, monócitos e macrófagos são células da imunidade inata que expressam receptores de superfície para manose, para LPS (CD14), para componentes do sistema complemento, porção Fc de moléculas de imunoglobulinas e TLRs, através dos quais são capazes de reconhecer microrganismos, levando à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (Means *et al.*, 2000; Underhill & Ozinsky, 2002; Roeder *et al.*, 2004). Dentre esses receptores de superfície de macrófagos, os mais caracterizados são os receptores de manose (MR) e os receptores para o componente C3 do sistema complemento, ambos capazes de mediar a fagocitose e a morte intracelular de microrganismos patogênicos (Linehan *et al.*, 2000).

Outros PRRs também poderiam estar envolvidos no reconhecimento fúngico. Dentre eles podemos destacar as lectinas do tipo C (*C-type lectin receptors*, CLRs) que são uma grande família de moléculas ligadoras de carboidrato cálcio-dependentes expressas em macrófagos, células dendríticas e outros leucócitos (Willment & Brown, 2008). Vários CLRs como o receptor de manose (MR) e a Dectina-1 estão envolvidos na imunidade antifúngica e seu papel não tem sido totalmente esclarecido (Willment & Brown, 2008).

O receptor Dectina-1 é altamente expresso na membrana de monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Brown & Gordon, 2001; Brown *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2009), podendo também ser encontrado em subpopulações de células T (Brown & Gordon, 2003). São os principais receptores de reconhecimento de β -glucanas, especialmente β -(1,3)-glucanas, principais componentes da parede celular da maioria dos fungos, que compreendem, na realidade, cerca de 60% do peso seco da parede celular fúngica, sendo assim consideradas como os principais PAMPs envolvidos na interação fungo-hospedeiro (Tsoni & Brown, 2008; Bowman & Free, 2006). Além disso, também é capaz de reconhecer β -glucanas presentes em algumas bactérias e plantas (Brown & Gordon, 2001). Os mecanismos pelos quais a dectina-1 reconhece esses carboidratos ainda não estão esclarecidos, embora tenha sido demonstrado recentemente, que diferentemente dos outros CLRs, a dectina-1 é uma ligadora de carboidrato cálcio-independente (Drummond & Brown, 2011). A dectina-1 também pode reconhecer outras moléculas não identificadas incluindo ligantes endógenos de células T e ligantes de mycobacteria (Marakalala *et al.*, 2010).

O receptor dectina-1 é codificado por genes localizados na região telomérica do cromossomo 6 de camundongo, e no cromossomo humano 12q, onde muitos

genes lectinas do tipo C (*C-type lectin genes*) estão localizados e formam *clusters* (Saijo & Iwakura, 2011). Esses receptores são proteínas transmembranas glicosiladas do tipo II com domínio extracelular de reconhecimento de carboidrato único (CTLN – C-type lectin-like domain) e membro do grupo V dos receptores como lectina do tipo - C, altamente conservados entre camundongos e humanos, e identificadas originalmente como moléculas específicas de células dendríticas (Drickamer, 1999; Ariizumi *et al.*, 2000; Zelensky & Gready, 2005; Saijo & Iwakura, 2011). Possuem um domínio na sua porção citoplasmática ITAM-like (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), encontrado em muitos outros receptores, através do qual a dectina-1 pode induzir sinal intracelular resultando em uma variedade de respostas que tem sido caracterizadas utilizando zimosan (Vautier *et al.*, 2012). Essas respostas compreendem a ativação da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao zimosan em macrófagos, neutrófilos e DCs (Brown & Gordon, 2001; Gantner *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2008). Embora seja bem aceito que a Dectina-1 seja proeminente ativadora dessas funções em camundongos, o papel desse receptor em fagócitos humanos ainda é incerto, uma vez que os estudos recentes apresentam dados conflitantes (Kennedy *et al.*, 2007 ; van Bruggen *et al.*, 2009).

Outra função bem caracterizada da Dectina-1 é a produção de mediadores lipídicos (Suram *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2010) e quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa, IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-23, CCL2, CCL3 (Dennehy *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2009). Essa produção é controlada por várias vias de sinalização que têm extenso *cross-talk* com outras vias ativadas por diferentes PRRs, e isso é essencial para uma imunidade antifúngica eficaz (Netea *et al.*, 2006). Foi recentemente demonstrado que a produção de IL-1 β

requer colaboração entre Dectina-1 e o inflamasoma NLRP3. NLRP3 é ativado em resposta a β -glucanas (como curdlan), e este é dependente de Dectina-1 e Syk. Embora os detalhes moleculares desta via ainda estão sendo estudados, tem sido demonstrado que a produção de ROS e um efluxo de potássio são necessários, e pode haver uma dependência parcial de TLR2 (Gross *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Lamkanfi *et al.*, 2009; Kankkunen *et al.*, 2010; Said-Sadier *et al.*, 2010). Dectina-1 foi o primeiro exemplo descrito de sinalização de PRR *non*-TLR e também foi a primeira descrição de um receptor que poderia colaborar com os TLRs (Brown *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2003; Brown, 2006).

Através de sua especificidade para β -glucanas, a dectina-1 pode reconhecer uma variedade de espécies fúngicas incluindo o *Coccidioides* (Viriyakosol *et al.*, 2005), *Saccharomyces* (Brown *et al.*, 2003), *Aspergillus* (Hohl *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2005; Gersuk *et al.*, 2006), *Pneumocystis* (Steele *et al.*, 2003), *Candida* (Brown *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2006; Gow *et al.*, 2007), *Cryptococcus neoformans* (Giles *et al.*, 2009) e *P. brasiliensis* (Bonfim *et al.*, 2009).

Também tem sido demonstrado o papel protetor da dectina-1 *in vivo*. Camundongos infectados com *A. fumigatus*, que tiveram as funções da Dectina-1 bloqueada durante desafio intratraqueal, através da utilização de um inibidor solúvel, apresentaram redução significativa da resposta inflamatória e aumento de carga fúngica pulmonar (Steele *et al.*, 2005). Estudos utilizando camundongos *knockout* para dectina-1 revelaram também um papel importante para este receptor na imunidade antifúngica *in vivo*, embora existam dados conflitantes sobre a participação desse receptor na resistência fúngica em diferentes linhagens. Em uma linhagem, a deficiência de dectina-1 resultou em deficiências na resposta

inflamatória e na morte fúngica, levando a um aumento da susceptibilidade na infecção sistêmica por *C. albicans* (Taylor *et al.*, 2007). Este estudo foi corroborado por achados em linhagens deficientes de CARD9, componente desencadeante da via de sinalização de dectina-1, que também apresentaram susceptibilidade aumentada à infecção pelo mesmo patógeno (Gross *et al.*, 2006). Entretanto, outra linhagem de camundongo deficiente de dectina-1 não apresentou alterações na resistência à infecção por *C. albicans* (Saijo *et al.*, 2007), mas demonstrou diferentes resultados quando infectado com *P. carinii*, com aumento de carga fúngica devido a alterações no *burst* respiratório de macrófagos (Saijo *et al.*, 2007). A mesma linhagem foi utilizada recentemente para demonstrar que a dectina-1 não está envolvida na resistência ao *C. neoformans* (Nakamura *et al.*, 2007). No entanto, trabalho demonstrou que a dectina-1 expressa na superfície de macrófagos alveolares é capaz de reconhecer a β -glucana exposta nos esporos do *C. neoformans in vitro*, demonstrando sua participação no reconhecimento fúngico (Giles *et al.*, 2009).

Em trabalho recente, foi identificada a participação da dectina-1 na indução de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS 1), identificadas como inibidores negativos de receptores de citocinas do tipo I e II, dessa forma modulando negativamente a sinalização de TLR e resposta de células T (Eberle & Dalpke, 2012).

A interleucina-18 (IL-18), originalmente chamada de Fator Indutor de IFN- γ , é uma citocina pleiotrópica, com importante participação tanto na resposta imune inata ou adquirida, secretada por macrófagos e monócitos ativados, linfócitos T e B, células dendríticas e epiteliais (Okamura *et al.*, 1995; Ghayur *et al.*, 1997; Gardella *et*

al., 1999; Gerdes *et al.*, 2002). Dependendo do contexto de estimulação, do microambiente de citocinas e da predisposição genética, a IL-18 pode promover tanto uma resposta do tipo Th₁ ou Th₂ (Nakanishi *et al.*, 2001). Embora os efeitos pleiotrópicos da IL-18 sugere uma importante participação na modulação de citocinas Th₂, quando atuando independentemente da ação da IL-12 (Hoshino *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2000; Helmbj *et al.*, 2001; Leite-de-Moraes *et al.*, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2003), sua principal função seria de promover a secreção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF e a expressão de moléculas de adesão em monócitos e macrófagos e a produção de IFN- γ pelas células T, B e NK, potencializada pela ação da IL-12 (Okamura *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Reddy, 2004).

Pesquisadores têm apresentado vários resultados demonstrando a importância da IL-18 em infecções bacterianas e fúngicas causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Sugawara *et al.*, 1999; Kinjo *et al.*, 2002), *M. avium* (Shiratsuchi & Ellner, 2001), *Legionella pneumophila* (Brieland *et al.*, 2000), *C. neoformans* (Qureshi *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2000a; Kawakami *et al.*, 2000b; Kawakami, 2002) *C. albicans* (Netea *et al.*, 2003; Stuyt *et al.*, 2004; Tardif *et al.*, 2004) e *A. fumigatus* (Cenci *et al.*, 1998; Brieland *et al.*, 2001; Phadke *et al.*, 2005).

No entanto, na paracoccidioidomicose, trabalhos têm demonstrado que camundongos KO em IL-18 (IL-18 $-/-$) e infectados por *P. brasiliensis* foram mais resistentes à infecção, apresentando uma menor carga fúngica e menor taxa de mortalidade, quando comparado com os animais controles, demonstrando que neste modelo a IL-18 contribuiu para o agravamento da doença, estando assim, associada à susceptibilidade (Panagio *et al.*, 2008). Camundongos controles apresentaram

maior taxa de mortalidade durante o primeiro mês de infecção, com maior número de unidades formadoras de colônias recuperadas dos pulmões, quando comparados aos camundongos IL-18^{-/-}. A análise histopatológica revelou a presença de granulomas bem formados em ambas linhagens, no entanto, diferenças foram observadas no segundo mês de infecção, quando ocorreu uma predominância de células epitelióides em lesões de camundongos IL-18^{-/-}, indicando que a IL-18 retarda a cura pulmonar dos camundongos (Panagio *et al.*, 2008).

Também foi demonstrado que pacientes com paracoccidioidomicose com a forma mais grave da doença (forma juvenil) apresentavam níveis séricos de IL-18 muito maiores quando comparados aos níveis dos indivíduos controles e de pacientes com a forma adulta da doença, apontando a participação da IL-18 na patogênese da doença (Corvino *et al.*, 2007).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a IL-18 possui uma ação importante sobre o aumento da expressão de TLR4 e MR em monócitos humanos (Dias-Melicio *et al.*, 2011a) e um papel modulador negativo sobre os mecanismos efetores contra o *P. brasiliensis*, uma vez que essa citocina foi capaz de promover condições favoráveis ao crescimento fúngico, sendo esse efeito relacionado com o reconhecimento do *P. brasiliensis* via MR que causaria aumento do crescimento do *P. brasiliensis* no interior das células (Dias-Melicio *et al.*, 2011b).

Embora esses resultados acima apontem para uma ação negativa da IL-18 na paracoccidioidomicose, e visto a importância da dectina-1 no reconhecimento fúngico e sua participação na imunidade antifúngica em outras infecções, tornou-se interessante o estudo da interação das diferentes cepas de *P. brasiliensis* com o receptor dectina-1 da superfície de monócitos humanos, e a avaliação da ação da

IL-18 sobre a modulação deste receptor e sobre a produção de citocinas importantes como TNF- α e IL-10, permitindo uma melhor compreensão das vias de ativação dessas células durante o confronto fungo-monócito.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) Avaliar a ação da IL-18 sobre a expressão do receptor dectina-1 em monócitos humanos desafiados *in vitro* com diferentes cepas do *P. brasiliensis*;
- b) Avaliar a participação da dectina-1 no reconhecimento fúngico e consequente indução da produção de IL-18, TNF- α e IL-10 por monócitos desafiados *in vitro* com diferentes cepas do *P. brasiliensis*.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram avaliados monócitos obtidos de 30 mL de sangue periférico de 16 indivíduos normais, doadores de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento livre e esclarecido.

3.2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Of. 151/2012).

3.3. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foram utilizadas a cepa 18 de *P. brasiliensis* (Pb 18), considerada virulenta; e a cepa 265 de *P. brasiliensis* (Pb 265), considerada avirulenta. Ambas foram mantidas em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY (glicose 1,5 %, peptona 1 % e extrato de levedura 0,5 %) a 37°C, em tubos de 20 x 20 mm. As culturas foram utilizadas após 6 dias de cultivo.

3.4. Teste de viabilidade do *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas de acordo com o item 3.3. Após o crescimento, essas células foram coletadas da superfície de cultivo através de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, ST Louis, MO, USA), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vórtex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas em repouso durante 3 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, e uma alíquota da mesma foi utilizada para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que se apresentaram com aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com a parede escura. Foram utilizadas as suspensões que apresentarem pelo menos 95% de viabilidade (Soares *et al.*, 2001). A concentração da suspensão fúngica utilizada nos ensaios foi de 2×10^4 fungos viáveis/mL nas macroculturas, estabelecendo-se uma relação fungo/monócito de 1:50.

3.5. Isolamento e cultura de monócitos do sangue periférico

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa, sendo colocados em tubos estéreis contendo 200µL de heparina (Liquemine-Roche). As

células mononucleares foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (SIGMA-ALDRICH). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado inicialmente com meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) por 10 minutos a 200g e, seguido de mais uma lavagem com meio de cultura RPMI 1640 por mais 10 minutos a 200g. Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC). A contagem, identificação e viabilidade dos monócitos foram realizadas através da incorporação pelo vermelho neutro (alíquotas de 50 µL da suspensão celular foram incubadas a 37°C durante 10 minutos com 0,45 mL da solução do corante a 0,02%). Para realização das culturas de monócitos, a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 monócitos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular (1000µL/orifício) em placas de macrocultura de fundo chato com 24 orifícios, para realização dos ensaios de citometria de fluxo. Para a obtenção de sobrenadantes de cultura para as dosagens de IL-18, TNF- α , e IL-10, a concentração também foi ajustada para 1×10^6 monócitos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular (1000µL/orifício) em placas de macrocultura de fundo chato com 24 orifícios. Após uma hora de incubação a 37°C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes das culturas de monócitos foram eliminadas através de lavagens das placas de macrocultura com meio de cultura RPMI 1640 a 37°C.

3.6. Avaliação da expressão de dectina-1 na superfície de monócitos por citometria de fluxo

Células mononucleares foram obtidas por meio de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque e incubadas a 37 °C, em tensão de 5% de CO₂ por 1 hora. A concentração celular foi previamente ajustada para 1x10⁶ monócitos/mL, após contagem em câmara hemocitométrica, sendo distribuídos em placas de cultura de 24 orifícios, incubados por 1h, com retirada das células não aderentes após esse período. Os monócitos isolados foram então incubados por 18 horas, na ausência ou na presença de IL-18 (100 ng/mL), seguido do desafio com as diferentes cepas de *P. brasiliensis*, durante 4 horas. Para recuperação da monocamada de monócitos da placa de macrocultura, para avaliação por citometria de fluxo, foi utilizado Hyqtase (HyQ[®]Tase[™] cell detachment solution) da HyClone Cell Culture and Bioprocessing (Thermo Fisher Scientific Inc., GA, USA). As placas foram colocadas e mantidas sobre gelo durante todo o processo de descolamento de monócitos. Após a coleta do sobrenadante, as células foram tratadas com 200 µL de solução Hyqtase gelada por 5 minutos. Após esse período, as células foram lavadas com 1mL de Solução de Isoton II gelado (BD labware), recuperadas e centrifugadas em tubos Falcon para citômetro (BD Labware). As células foram então incubadas com anti-dectina-1 conjugado com PE (Mouse Anti Human Dectin-1/MCA4661PE Antibody – AbD Serotec), e com anti-CD14 conjugado com FITC (BD Pharmingen) durante 20 min no escuro, de acordo com instrução de cada fabricante. Para cada teste, um tubo controle foi incubado com anticorpos controles isotípicos, marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. Após, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 300 g para lavagem e ressuspendidas em 250 µL de ISOTON II, fixadas com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD Labware). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR[™] (Becton Dickinson) usando programas “Cell Quest” (Becton Dickson) para adquirir e analisar

multiparâmetros celulares. Foi padronizada a aquisição de 10.000 eventos por amostra e foi otimizada a população de interesse, população CD14⁺ (monócitos), estabelecendo-se *gate* (janela) com base em parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e fluorescência (FL1 – anti-CD14 FITC e FL2 – anti-dectina-1 PE). A expressão de fluorescência foi verificada em FL1 e FL2, detectores específicos aos comprimentos de ondas emitido pelos fluorocromos utilizados.

3.7. Bloqueio da ligação do *P. brasiliensis* ao receptor dectina-1 utilizando-se anticorpo monoclonal

A avaliação da participação do receptor dectina-1 no reconhecimento do *P. brasiliensis* e consequente indução das citocinas IL-18, IL-10 e TNF-alfa - α foi realizada através da inibição seletiva da interação do *P. brasiliensis* com o receptor dectina-1, utilizando-se tratamento prévio destas células (2 horas antes do desafio com *P. brasiliensis*) com anticorpo monoclonal anti-dectina-1 de bloqueio (Monoclonal Anti-Human Dectin-1/CLEC7A Antibody, R&D Systems).

Ensaio de padronização foram realizados para identificação da melhor dose de anticorpo anti-dectina-1 para bloqueio do receptor, testando-se 3 diferentes doses do anticorpo (0.75, 1.5 e 3.0 μ g/mL).

3.8. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos de indivíduos saudáveis

Monócitos de indivíduos saudáveis, obtidos conforme descrito no item 3.5 foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂, na ausência ou na presença de IL-18 (100 ng/mL), durante 18 horas, seguido do desafio com ambas as cepas de *P. brasiliensis*. Para avaliação da participação do receptor dectina-1 na indução da produção de IL-18, TNF- α e IL-10, duas horas antes do desafio com o fungo, os monócitos foram tratados ou não com anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (3 μ g/mL) (R&D Systems) para realização do bloqueio do receptor, impedindo-se assim o reconhecimento fúngico pelo receptor. Após 18 horas de tratamento com IL-18, seguido de 4 horas de cocultivo com *P. brasiliensis*, os sobrenadantes das culturas foram aspirados, submetidos à centrifugação para eliminação de células fúngicas e armazenados a -80°C para posterior dosagem de IL-18, TNF- α e IL-10 pela técnica de ELISA.

3.9. Dosagem de IL-18, TNF- α e IL-10.

A quantificação de IL-18, TNF- α , e IL-10 em sobrenadantes de culturas de monócitos humanos foi realizada pela técnica de ELISA, utilizando-se os kits Human IL-18 ELISA Kit da MBL (Medical & Biological Laboratories CO. LTD, Nagoya, Japan) e BD OptEIA™ (Human TNF-alpha ELISA Set, Human IL-10 ELISA Set) e Reagent Set B kit (reagentes complementares dos kits para realização das dosagens), todos da BD Biosciences, San Diego, CA.

Para cada dosagem de cada citocina, placas certificadas de 96 orifícios e fundo plano (NUNC – MaxiSorp Surface) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, preparados em tampão de cobertura

(Coating Buffer - Reagent Set B kit), incubadas "over night" a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas quatro vezes com Wash Concentrate 20X (Reagent Set B kit), e bloqueadas com reagente diluente (Assay Diluent - Reagent Set B kit). O período de bloqueio foi de 1h à temperatura ambiente, seguido de quatro lavagens com Wash Concentrate 20X (Reagent Set B kit). As amostras testes foram colocadas nos orifícios em duplicatas, num volume de 100 µL, e a citocina recombinante referente à cada dosagem foi preparada em reagente diluente (Assay Diluent - Reagent Set B kit) e colocada em duplicata, em concentrações variando de 2000 a 31,25 pg/mL para a realização da curva padrão do ensaio. As placas foram incubadas novamente por 2 h à temperatura ambiente.

Após a retirada das amostras das placas e posterior lavagem, 4 vezes com Wash Concentrate 20X (Reagent Set B kit), foi adicionado o anticorpo detector de trabalho (Working Detector), conforme a dosagem a ser realizada, preparado em reagente diluente (Assay Diluent - Reagent Set B kit) acrescido de conjugado estreptoavidina - peroxidase (SAv-HRP reagent), na concentração indicada pelo fabricante, com posterior incubação das placas por 1 h à temperatura ambiente, seguida de 5 lavagens com Wash Concentrate 20X (Reagent Set B kit). Como substrato da reação foi utilizada solução de Peróxido de Hidrogênio e TMB-tetrametilbenzidina (Substrate Reagent A e Substrate reagent B - Reagent Set B kit). Após o tempo de reação, à temperatura ambiente e em câmara escura, o bloqueio foi realizado com solução stop (Stop Solution - Reagent Set B kit).

A leitura da placa foi feita em leitor de ELISA, utilizando-se filtro duplo de 450 e 570 nm para correção de imperfeições óticas da placa.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da ação da IL-18 sobre a expressão de dectina-1 em monócitos

Após a padronização da melhor concentração de anticorpo anti-dectina-1 marcado com PE, para determinação da expressão do receptor na superfície de monócitos, iniciamos nossos experimentos para avaliação da ação da IL-18 sobre a expressão do receptor e análise da participação do receptor dectina-1 no reconhecimento do *P. brasiliensis*. Esses experimentos foram realizados no laboratório de citometria de fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu.

Nossos resultados demonstraram que após ativação com IL-18 na dose de 100ng/mL, dose já padronizada em nossos laboratórios e que demonstrou ter ações sobre a modulação de receptores TLR4 e manose (Dias-Melicio *et al.*, 2011a), não identificamos diferenças na expressão desse receptor quando comparamos com a expressão dos monócitos normais (figura 1).

No entanto, monócitos desafiados com diferentes cepas de *P. brasiliensis* apresentaram expressões diferenciadas na dependência da cepa avaliada. Monócitos desafiados com a cepa Pb 18 não apresentaram diferenças na expressão do receptor dectina-1 quando comparada com a expressão dos monócitos normais (figura 1). Já quando as células foram desafiadas com a cepa avirulenta de *P. brasiliensis* (Pb 265), ou mesmo tratadas com IL-18 e desafiadas com Pb 265, identificamos um aumento significativo na expressão do receptor dectina-1 quando comparamos com o controle e com as células somente tratadas com IL-18 (figura 1).

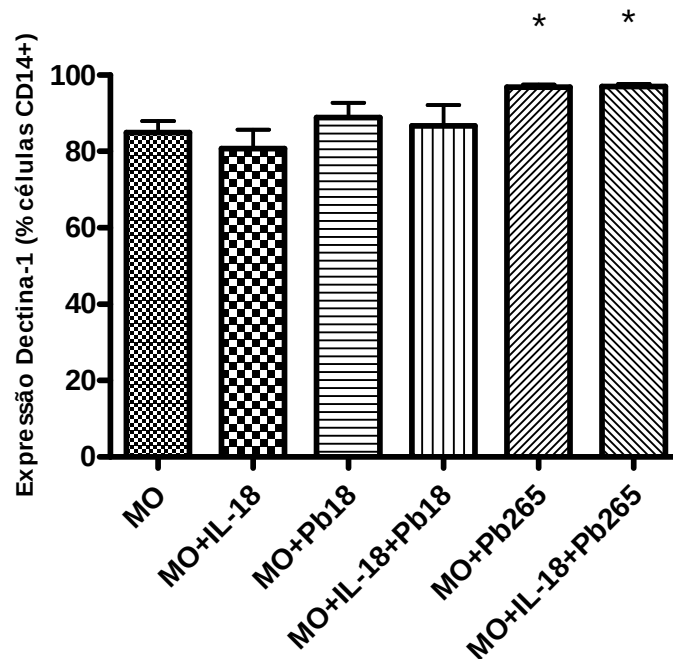


Figura 1. Expressão de dectina-1 em monócitos (% de CD14+) tratados ou não com IL-18 na dose de 100 ng/mL, durante 18 horas, seguido de desafio com diferentes cepas de *P. brasiliensis* (Pb 18 ou Pb265) por 4 horas. Os dados representam a média + SEM de 12 indivíduos testados. * $p < 0,05$ X MO (MCCC) e MO+IL-18.

Quando analisamos a média de intensidade de fluorescência (MIF), detectamos que a expressão do receptor dectina-1 foi muito maior no grupo de monócitos desafiados com a cepa avirulenta do *P. brasiliensis* (Pb 265) (figura 2).

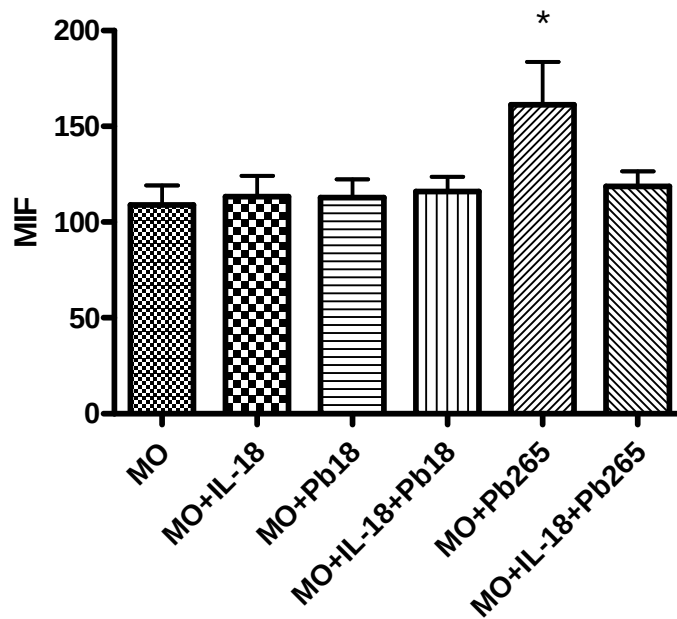


Figura 2. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de monócitos (CD14+) tratados ou não com IL-18 na dose de 100 ng/mL, durante 18 horas, seguido de desafio com diferentes cepas de *P. brasiliensis* (Pb 18 ou Pb265) por 4 horas. Os dados representam a média + SEM de 12 indivíduos testados. * $p < 0,05$ X todos os grupos.

4.2. Avaliação da ação da IL-18 e do receptor dectina-1 sobre a produção de citocinas

4.2.1. Padronização da concentração ideal de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 para a determinação do bloqueio do receptor em monócitos

Para avaliação da ação da IL-18 e do receptor dectina-1 sobre a produção de citocinas, realizamos inicialmente, ensaios para a padronização da melhor dose do anticorpo de bloqueio do receptor dectina-1 em monócitos. Para realização desses

experimentos foram testados 4 indivíduos, utilizando as concentrações de 0.75, 1.5 e 3 μ g/mL de anticorpo anti-dectina-1. Observamos que a melhor dose de anticorpo para bloqueio foi detectada com a dose de 3 μ g/mL (Figuras 3 e 4), que passou a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Nessa concentração atingimos a média de 95% de bloqueio, confirmando os dados da bula que diziam que nessa dose (3 μ g/mL), 100% do bloqueio da interação receptor-ligante seria atingido. Esses experimentos foram avaliados no laboratório de Citometria de Fluxo, da Fundação Amaral Carvalho, na cidade de Jaú-SP.

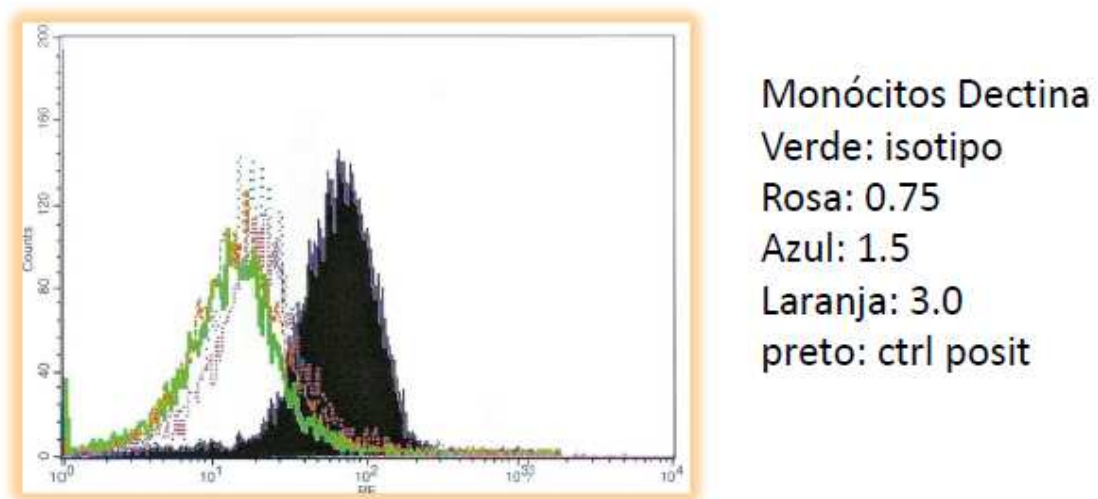


Figura 3. Histograma de sobreposição de um experimento representativo da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) para Dectina-1, de monócitos normais (preto) ou monócitos tratados com 0.75 μ g/mL (linha rosa), 1.5 μ g/mL (linha azul) e 3.0 μ g/mL (linha laranja) de anticorpo anti-dectina-1. A linha verde representa MIF do controle isotípico.

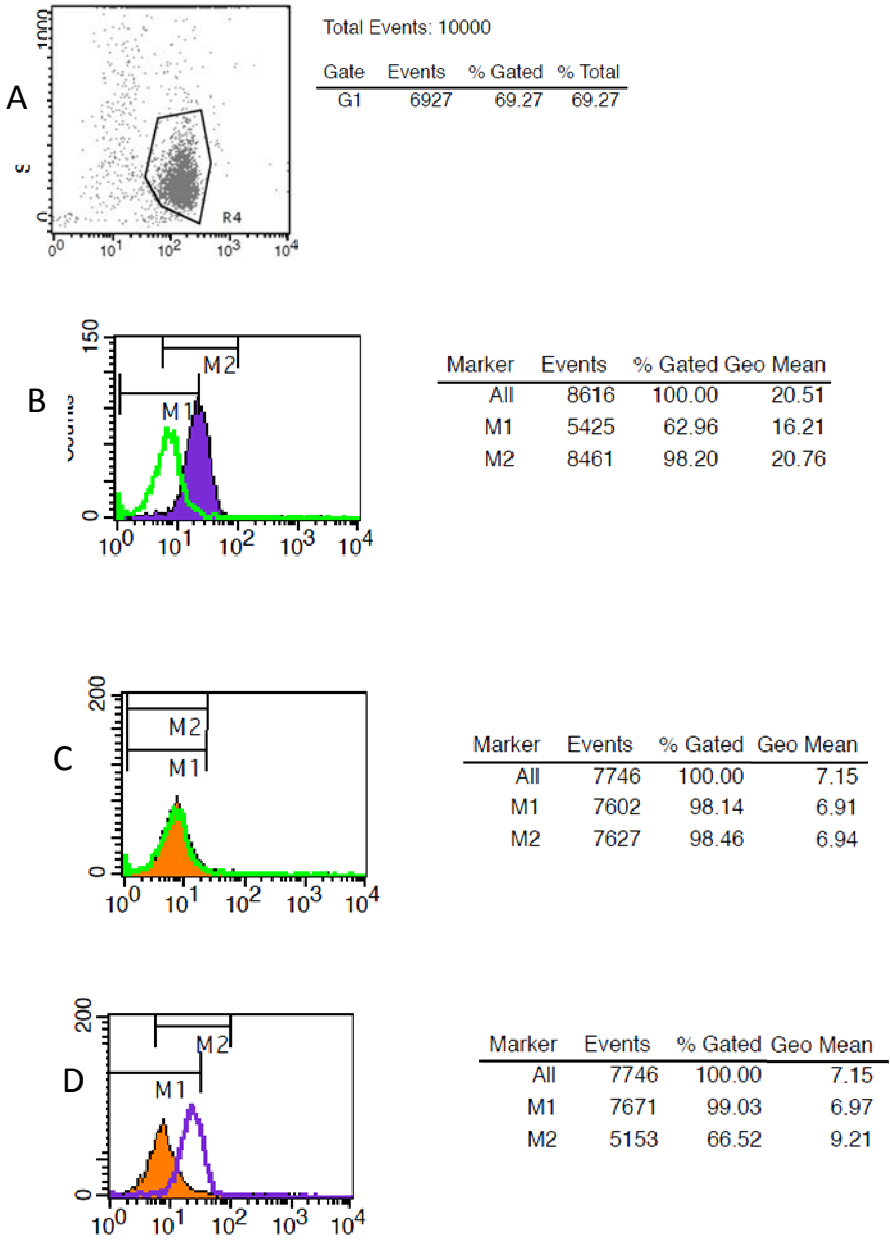


Figura 4. Histogramas de sobreposição representativos da Media de Intensidade de Fluorescência (MIF) para dectina-1 de um experimento nas diferentes condições de culturas: monócito e monócitos tratados com anti-dectina-1 (3µg/mL). Após a aquisição foi gerado um gráfico de dot-plot (A) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a região de análise (R1). B, C e D representam histogramas de intensidade de fluorescência em função do “confronto” entre controle isotópico (verde), controle positivo (monócito normal) (roxo) e índice de bloqueio (laranja). As tabelas ao lado dos histogramas representam a % de células dentro das regiões analisadas (% gated) e a intensidade média de fluorescência (geo mean).

4.2.2. Produção de IL-18

Os resultados referentes à produção de IL-18 demonstram que monócitos normais produzem baixos níveis dessa citocina (figura 5). No entanto, ao desafiarmos essas células com a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb 18) houve um aumento significativo nos níveis de IL-18 produzidos nessas culturas. Nas coculturas tratadas com anticorpo monoclonal anti-dectina-1 e desafiadas com Pb 18, embora tenham demonstrado uma pequena diminuição nos níveis da citocina, os dados não foram estatisticamente diferentes do grupo somente desafiado (figura 5). Em relação às coculturas desafiadas com a cepa Pb 265, embora os níveis de IL-18 se mostraram um pouco maior que o controle, os dados não foram estatisticamente significativos. No entanto, os níveis detectados nas coculturas desafiadas com a cepa Pb 265 foram bem menores do que os níveis produzidos no grupo desafiado com a cepa virulenta. O bloqueio do receptor com anticorpo anti-dectina-1 também não alterou os níveis produzidos pelas células desafiadas com a cepa avirulenta (figura 5). Não procedemos às dosagens de IL-18 nas culturas tratadas com IL-18, pois dosaríamos a IL-18 recombinante que foi utilizada nas culturas como tratamento.

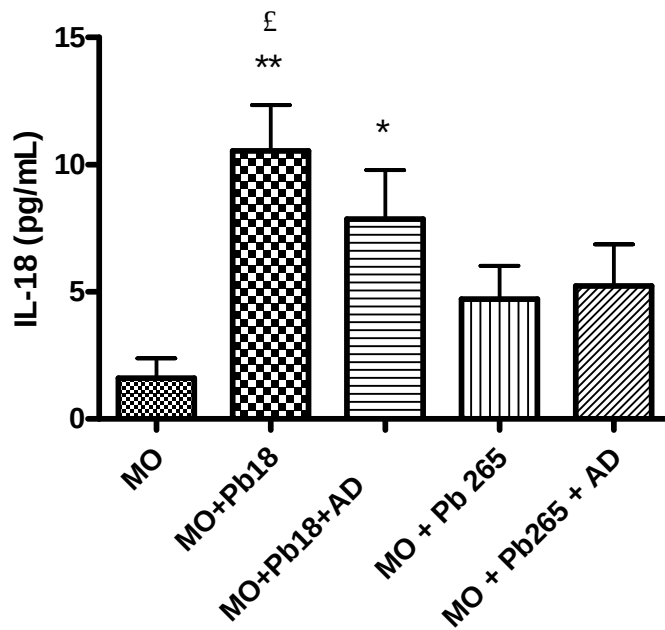


Figura 5. Produção de IL-18 por monócitos não tratados com IL-18, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (3 μ g/mL) (AD), seguido de desafio com diferentes cepas de *P. brasiliensis* (Pb 18 ou Pb 265) por 4 horas. Os dados representam a média + SEM de 12 indivíduos testados. ** $p < 0,01$ X MO; * $p < 0,05$ X MO; £ $p < 0,05$ X MO+Pb 265.

4.2.3. Produção de TNF- α

Dados interessantes foram observados ao avaliarmos as concentrações de TNF- α nas culturas tratadas com IL-18 e/ou desafiadas com diferentes cepas de *P. brasiliensis*, que corroboram os resultados já observados em trabalhos anteriores de nosso laboratório (Dias-Melicio *et al.*, 2011b), e que podem ser observados na figura 6. Monócitos normais apresentaram baixos níveis de TNF- α e quando as células foram ativadas com IL-18, níveis altíssimos dessa citocina foram produzidos,

demonstrando mais uma vez um papel importante da IL-18 como estimuladora direta da produção dessa citocina. Quando observamos as culturas desafiadas com diferentes cepas de *P. brasiliensis*, detectamos também que a cepa Pb 265 sozinha, induz uma maior produção de TNF- α quando comparada com a cepa Pb 18. No entanto, a produção induzida pela IL-18 foi inibida quando as células foram tratadas com IL-18 e desafiadas com as duas cepas.

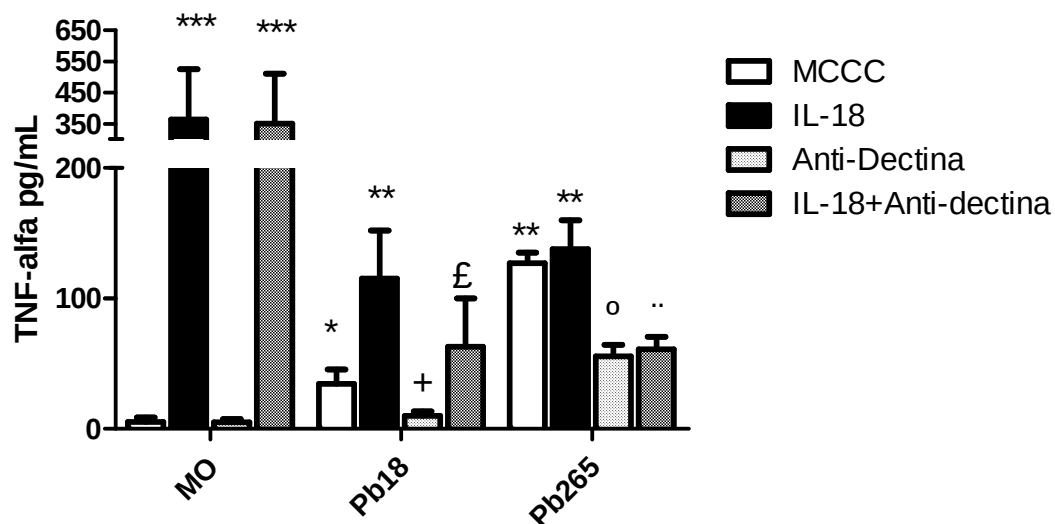


Figura 6. Produção de TNF-alfa por monócitos tratados ou não com IL-18 na dose de 100 ng/mL, durante 18 horas, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (3 μ g/mL), seguido de desafio com *P. brasiliensis* (Pb 18 e Pb 265) por 4 horas. Os dados representam a média + SEM de 12 indivíduos testados. * $p < 0,05$ X MO (MCCC); ** $p < 0,01$ X MO (MCCC); *** $p < 0,001$ X MO (MCCC); + $p < 0,05$ X Pb 18 (MCCC); £ $p < 0,05$ X IL-18 + Pb 18; ° $p < 0,05$ X Pb 265 (MCCC); °° $p < 0,05$ X IL-18 + Pb 265.

Na figura 6 também podemos observar o efeito do bloqueio do receptor dectina-1 realizado com anticorpo monoclonal, antes do desafio com as cepas de *P. brasiliensis*. Observamos claramente que o efeito da IL-18 sobre a produção de TNF- α não foi alterada com o tratamento das células não desafiadas com o anticorpo. A produção de TNF- α induzida tanto pelo Pb 18, como pelo Pb 265 em concentrações maiores, foram ambas inibidas com o tratamento com anticorpo anti-dectina-1, demonstrando a participação desse receptor no reconhecimento fúngico e na indução de TNF- α via receptor. Os resultados das culturas tratadas com IL-18 e desafiadas com Pb 18 demonstram a produção de níveis maiores de TNF- α , quando comparadas somente com as culturas desafiadas com Pb 18. O bloqueio do receptor dectina-1 com anticorpo monoclonal nas culturas tratadas com IL-18 e desafiadas com Pb18 e Pb 265 também diminuiu significativamente os níveis de TNF- α induzidos.

4.2.4. Produção de IL-10

Os resultados relativos à produção de IL-10 são mostrados na figura 7. Nossos dados mostraram que monócitos normais possuem uma produção basal de IL-10, que não foi alterada com tratamento com anticorpo monoclonal de bloqueio. Podemos notar que a IL-18 também apresentou um efeito sobre a indução de IL-10 nos monócitos apenas tratados com a citocina. Ao desafiarmos as células com as duas cepas identificamos diferenças estatisticamente significativas entre monócitos apenas desafiados e monócitos controles. No entanto, a cepa Pb18 foi capaz de induzir níveis muito maiores de IL-10 quando comparada com a cepa Pb265,

demonstrando uma maior capacidade da cepa virulenta em induzir a produção de IL-10. Ao analisarmos os grupos de células que foram tratados com a IL-18 seguido de posterior desafio com as cepas, observamos que os níveis de IL-10 no grupo desafiado com Pb 18 não foram alterados em relação às células somente tratadas com IL-18, e em relação às células apenas desafiadas com a cepa. No entanto, as células tratadas com IL-18 e desafiadas com Pb 265 apresentaram o mesmo perfil de produção das células somente desafiadas com a cepa avirulenta. Os grupos tratados com anticorpo anti-dectina-1 para bloqueio do receptor, embora tenham apresentado uma pequena diminuição nos níveis de IL-10 induzidos por IL-18 e/ou pelas diferentes cepas, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

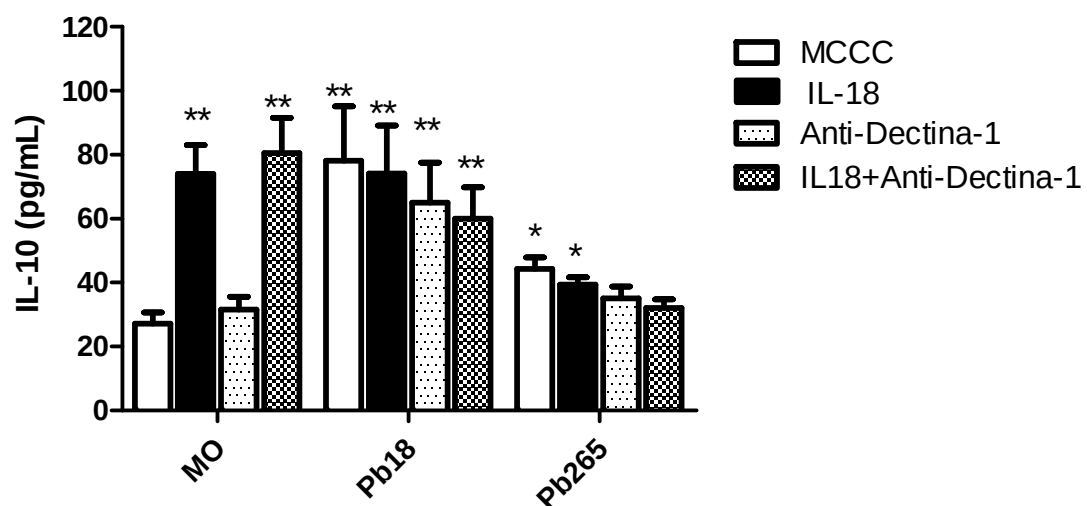


Figura 7. Produção de IL-10 por monócitos tratados ou não com IL-18 na dose de 100 ng/mL, durante 18 horas, na presença ou não de anticorpo monoclonal anti-dectina-1 (3 µg/mL), seguido de desafio com *P. brasiliensis* (Pb 18 e Pb 265) por 4 horas. Os dados representam a média + SEM de 12 indivíduos testados. * $p < 0,05$ X MO (MCCC); ** $p < 0,01$ X MO (MCCC).

5. DISCUSSÃO

Na paracoccidioidomicose sabe-se que a resposta 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; Romano *et al.*, 2002), e a imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate ao *P. brasiliensis* e no direcionamento dessa resposta efetora. Dentre os vários mecanismos envolvidos nesta resposta, os desenvolvidos pelas células fagocitárias desempenham papel central na resistência contra o fungo, com destaque para a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida. Estas funções, no entanto, dependem de mecanismos de ativação dessas células, gerados pela interação com o próprio fungo e receptores celulares ou com fatores da resposta imune inespecífica e específica, como as citocinas (Mencacci *et al.*, 2000; Antachopoulos *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2005; Calich *et al.*, 2008a e 2008b, Bonfim *et al.*, 2009; Acorci-Valério *et al.*, 2010; Nakaira-Takahagi *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, nossos estudos têm focado a ação da IL-18 nos mecanismos efetores celulares contra o *P. brasiliensis*. Visto que a IL-18 é uma citocina chave na indução de IFN-gama, sendo chamada originalmente de Fator Indutor de IFN- γ , e que vários trabalhos tem descrito a sua ação protetora em várias infecções bacterianas e fúngicas causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Sugawara *et al.*, 1999; Kinjo *et al.*, 2002), *M. avium* (Shiratsuchi & Ellner, 2001), *Legionella pneumophila* (Brieland *et al.*, 2000), *C. neoformans* (Qureshi *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2000a; Kawakami *et al.*, 2000b; Kawakami, 2002) *C. albicans* (Netea *et al.*, 2003; Stuyt *et al.*, 2004; Tardif *et al.*, 2004) e *A. fumigatus* (Cenci *et al.*,

1998; Brieland *et al.*, 2001; Phadke *et al.*, 2005), pensamos inicialmente em sua participação como uma citocina indutora de mecanismos efetores contra o fungo. No entanto, em trabalho anterior, ao avaliarmos a ação da IL-18 sobre a atividade fungicida de monócitos contra o *P. brasiliensis*, identificamos um efeito contrário ao esperado, uma vez que células tratadas com IL-18 e desafiadas com as cepas virulenta (Pb18) e avirulenta (Pb265) apresentaram um aumento significativo na recuperação fúngica (Dias-Melicio *et al.*, 2011b). Estes resultados demonstraram que a IL-18 não possui uma ação ativadora da atividade fungicida de monócitos contra o *P. brasiliensis*. Na realidade, nossos resultados indicaram uma participação da IL-18 na facilitação do crescimento fúngico intracelular, uma vez que a neutralização da citocina com anticorpo monoclonal anti-IL-18, resultou em diminuição da recuperação fúngica nas culturas, revertendo o efeito do tratamento (Dias-Melicio *et al.*, 2011b). Esse aumento de recuperação fúngica esteve associado a um aumento da expressão de receptor de manose (MR), uma vez que a IL-18 aumentou a expressão desse receptor, e os ensaios de bloqueio utilizando anticorpo monoclonal anti-MR, comprovaram sua participação no efeito exercido por essa citocina, provavelmente disparando uma nova via molecular com ativação de PPAR γ , que regula negativamente a resposta inflamatória de macrófagos (Jiang *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1999; Von Knethen & Brüne, 2002; Rajaram *et al.*, 2010; Dias-Melicio *et al.*, 2011b).

Nossos dados anteriores (Dias-Melicio *et al.*, 2011b) corroboram os dados obtidos por Panagio *et al.* (2008) que demonstraram a participação da IL-18 na susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*. Os autores observaram que camundongos KO em IL-18 (IL-18 $-/-$) e infectados por *P. brasiliensis* foram mais resistentes à infecção, apresentando uma menor carga fúngica e menor taxa de

mortalidade, quando comparado com os animais controles, demonstrando que neste modelo a IL-18 contribuiu para o agravamento da doença, estando assim, associada à susceptibilidade. Camundongos controles apresentaram maior taxa de mortalidade durante o primeiro mês de infecção, com maior número de unidades formadoras de colônias recuperadas dos pulmões, quando comparados aos camundongos IL-18^{-/-}. A análise histopatológica revelou a presença de granulomas bem formados em ambas linhagens, no entanto, diferenças foram observadas no segundo mês de infecção, quando ocorreu uma predominância de células epitelióides em lesões de camundongos IL-18^{-/-}, indicando que a IL-18 retarda a cura pulmonar dos camundongos.

Dessa forma, tornou-se extremamente interessante a avaliação da ação da IL-18 sobre a modulação do receptor dectina-1, uma vez que são receptores altamente expressos na membrana de fagócitos (Brown & Gordon, 2001; Brown *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2009), sendo os principais receptores de reconhecimento de β -glucanas, especialmente β -(1,3)-glucanas, principais componentes da parede celular da maioria dos fungos. As β -(1,3)-glucanas compreendem, na realidade, cerca de 60% do peso seco da parede celular fúngica, sendo assim consideradas como os principais PAMPs envolvidos na interação fungo-hospedeiro (Tsoni & Brown, 2008; Bowman & Free, 2006). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que a dectina-1 pode induzir uma série de respostas celulares protetoras contra fungos, tais como fagocitose e atividade fungicida, que são mediadas, pelo menos em parte, pela indução do *burst* respiratório (Gantner *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2003; Luther *et al.*, 2007). Essas interações também levam à indução de numerosas citocinas e quimiocinas, incluindo MIP-1 α , GM-CSF, G-CSF, TNF- α , MIP-2, IL-1 β , IL-1 α , IL-23, IL-10, IL-2 e IL-6 (Steele *et al.*, 2003; Brown *et al.*,

2003; Rogers *et al.*, 2005; Steele *et al.*; 2005; Viriyakosol *et al.*, 2005; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007).

Nossos resultados demonstraram que a IL-18 não possui ação moduladora sobre a expressão do receptor dectina-1 na superfície de monócitos. Quando as células foram desafiadas com a cepa virulenta do fungo, também não detectamos alterações nos níveis de expressão do receptor. Houve um aumento da expressão do receptor dectina-1 quando os monócitos foram desafiados com a cepa avirulenta Pb 265. Este efeito pode ser resultante do reconhecimento da cepa avirulenta Pb 265, com maior ligação e ativação de receptores dectina-1, uma vez que foi demonstrado que cepas menos virulentas do *P. brasiliensis*, como a Pb 265, apresentam maior quantidade de β -glucanas na composição de suas paredes e induzem a uma resposta inflamatória bastante intensa (Silva *et al.*, 1994). No entanto, nossos resultados são discordantes de Bonfim *et al.* (2009), que avaliaram a expressão de TLR1, TLR2, TLR4 e dectina-1 em monócitos e neutrófilos de indivíduos saudáveis após estimulação de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, com alta ou baixa virulência e sugeriram a participação de TLR2, TLR4 e dectina-1 no reconhecimento, internalização e conseqüente ativação da resposta imune contra o fungo. No entanto, os autores demonstraram diminuição da expressão de dectina-1 após desafio com o fungo, podendo esse resultado ser decorrente da utilização de diferentes períodos de avaliação, realizada após 30 minutos de desafio, enquanto nossa avaliação foi somente feita depois de quatro horas de desafio.

Em relação às citocinas produzidas, nossos resultados demonstram que a cepa virulenta foi capaz de induzir uma maior concentração de IL-18 em relação à cepa avirulenta. Visto toda importância desta citocina até agora, e que pacientes com paracoccidiodomicose com a forma mais grave da doença (forma juvenil)

apresentam níveis séricos de IL-18 muito maiores quando comparados aos níveis dos indivíduos controles e de pacientes com a forma adulta da doença (Corvino *et al.*, 2007), é provável que esse achado desempenhe importante participação na patogênese da doença. Em trabalho recente, nas infecções causadas por vírus Epstein Barr (EBV), a IL-18 tem sido associada como marcador de severidade de doença, pelas concentrações séricas também estarem altamente elevadas nesses indivíduos (van de Veerdonk *et al.*, 2012).

Nossos resultados também demonstram que a IL-18 foi capaz de induzir altos níveis de TNF-alfa e IL-10 em monócitos somente tratados com a citocina. Quando avaliamos as células somente infectadas com as diferentes cepas observamos que a cepa virulenta (Pb18) foi capaz de induzir níveis menores de TNF- α e níveis maiores de IL-10 quando comparados aos detectados para a cepa avirulenta (Pb265). No entanto, quando avaliamos as células tratadas com IL-18 e desafiadas com as duas cepas, notamos que o efeito ativador de IL-18 sobre a produção de TNF- α observado nas células somente tratadas com IL-18, foi diminuído pelo desafio com o fungo. E mais interessante, quando bloqueamos o receptor dectina-1, com anticorpo monoclonal de bloqueio, obtivemos diminuição da produção de TNF- α , demonstrando a participação do receptor dectina-1 no reconhecimento do *P. brasiliensis* e na consequente indução de TNF- α via receptor dectina-1. Em relação à IL-10, embora o bloqueio do receptor tenha diminuído os níveis da citocina, os resultados não foram diferentes estatisticamente.

Trabalho recente demonstrou a modulação da expressão de TLR2, TLR4 e MR na superfície de monócitos humanos estimulados *in vitro* com células leveduriformes de *P. brasiliensis* ou com gp43, seu principal antígeno e, a produção de TNF- α e IL-10. Os resultados mostram que tanto o fungo como a gp43 foram

capazes de modular a expressão de TLR2 e TLR4 em relação às células controle não estimuladas. Entretanto, os resultados obtidos com estímulo de gp43 foram mais evidentes. Baixa expressão de TLR2 e alta de TLR4 por monócitos foram induzidas por gp43 em 4h de cultura, associadas com elevada produção de TNF- α . Entretanto, esse perfil inverteu-se após 18 h de cultura, observando-se maior expressão de TLR2 e menor de TLR4, associadas com maior produção de IL-10. Assim, a persistência de gp43 na cultura de monócitos por 18h pareceu aumentar a expressão de TLR2 e a produção de IL-10 por essas células (Nakaira-Takahagi *et al.*, 2011).

Em trabalho anterior, identificamos em monócitos desafiados com as duas cepas, que o reconhecimento fúngico também ocorre através de ligações via TLR4 e TLR2, e que a produção de TNF- α e IL-10 detectados nessas culturas estariam relacionadas preferencialmente ao TLR4 e TLR2 respectivamente, e que a ligação ao MR modularia negativamente a resposta de monócitos (Dias-Melicio *et al.*, 2011). Agora, com esse novo estudo, nosso conhecimento se amplifica, demonstrando que o receptor dectina-1 também trabalha em cooperação com os outros receptores TLRs, na indução de TNF- α em resposta ao *P. brasiliensis*.

Tem sido demonstrado que uma nova β -glucana particulada isolada de *Saccharomyces cerevisiae* (Glyc 101) estimula dectina-1 e TLR2, induzindo a produção de TNF- α em macrófagos humanos e murinos, envolvendo a via clássica de sinalização tirosina quinase e ativação de NF- κ B (Roy *et al.*, 2012). Em trabalho recente, foi demonstrado que o envolvimento do receptor dectina-1 amplifica a produção de TNF- α e IL-10 induzida por estimulação de TLR2 e TLR4 em resposta à

C. albicans, atuando assim em sinergismo com os receptores TLRs (Ferwerda *et al.*, 2008).

No entanto, antes do conhecimento gerado nesse estudo, a hipótese que explicaria os resultados relacionados à menor produção de TNF- α e maior produção de IL-10 pela cepa virulenta em comparação à cepa avirulenta, seria a capacidade da cepa Pb 18 em induzir uma maior expressão de MR, que contribuiria para a deflagração da via PPAR γ , com consequente inibição da produção de TNF- α (Dias-Melicio *et al.*, 2011). Agora, podemos, além desses fatores, descrever a indução de uma maior expressão do receptor dectina-1 pela cepa avirulenta, e consequentemente uma maior produção de TNF- α induzida via receptor dectina-1. Além disso, a maior indução de IL-18 pela cepa virulenta contribuiria na patogênese da doença.

Nossos resultados complementam nossos dados anteriores, demonstrando que a IL-18 não modula a expressão de um receptor importante como o receptor dectina-1, envolvido na resposta protetora contra fungos. Também identificamos a participação do receptor dectina-1 na indução de TNF- α , em decorrência do reconhecimento do *P. brasiliensis* pelo receptor. Esses novos dados abrem novas perspectivas de estudo da participação do receptor dectina-1 nos mecanismos efetores celulares contra o *P. brasiliensis*.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir que:

- A IL-18 não modula a expressão do receptor dectina-1 por monócitos humanos *in vitro*;
- A cepa avirulenta de *P. brasiliensis* aumenta a expressão do receptor dectina-1 por monócitos humanos desafiados *in vitro*;
- A produção de TNF- α induzida pelo *P. brasiliensis* é também mediada pelo receptor dectina-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature Immunol. 2001; 2: 675-680.

Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padrón F, Blanco L, Rodríguez M, Fernández N, Crespo MS. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. Mediators Inflamm. 2010; pii: 201929.

Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Haematol. 2005;129:583-596.

Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, *et al.* Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. J Biol Chem. 2000; 275: 20157-20167.

Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FR, Fazioli Rdos A, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. Clin Immunol. 2002; 103:185-195.

Bauer S, Hartmann G, Goodridge HS, Underhill DM. Fungal recognition by TLR2 and Dectin-1. In: Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Edited by Hofmanns F. Berlin, Heidelberg: Springer. 2008; 87-109.

Bonfim CV, Mamoni RL, Souza MH, Blotta L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2009; 17: 1-12.

Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays. 2006; 28:799-808.

Brieland JK, Jackson C, Hurst S, *et al.* Immunomodulatory role of endogenous interleukin-18 in gamma interferon-mediated resolution of replicative *Legionella pneumophila* lung infection. Infect Immun. 2000; 68: 6567-6573.

Brieland JK, Jackson C, Menzel F, *et al.* Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 2001; 69: 1554-1560.

Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, *et al.* Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. J Exp Med. 2002; 196: 407-412.

Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003; 19: 311-315.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. *Nature*. 2001; 413: 36-37.

Brown GD, Herre J, Williams DL, *et al*. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucan. *J Exp Med*. 2003; 197: 1119-1124.

Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 33-43.

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

Calich VLG, Costa TA, Felonato M, Arruda A, Bernardino S, Loures FV, *et al*. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. 2008b; 165: 223-236.

Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Ciênc Cult*. 1994; 46: 455-461.

Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, *et al.* Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis.* 1998; 178: 1750-1760.

Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, *et al.* The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur J Immunol.* 2000; 30: 1113-1119.

Colombo, A.L., Tobón, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F. and Nucci, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011; 49, 785-798.

Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZZ, Blotta MHSL. Serum IL-18 and sTNFRII are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147: 483-490.

Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 1379-1386.

Dias-Melicio LA, Fernandes RK, Golim MA, Rodrigues DR, Soares AMVC. Treatment of human monocytes with Interleukin (IL)-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production. *Inflammation Research.* 2011a; 60: S110-S110.

Dias-Melicio LA, Fernandes RK, Golim MA, Rodrigues DR, Soares AMVC. Interleukin (IL)-18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. *Inflammation Research*. 2011b; 60: S167-S168.

Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol*. 1999; 9: 585-590.

Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14: 392-399.

Eberle ME, Dalpke AH. Dectin-1 stimulation induces suppressor of cytokine signaling 1, thereby modulating TLR signaling and T cell responses. *J Immunol*. 2012; 188: 5644-5654.

Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol*. 2008; 10:2058-2066.

Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis*. 1989; 4: 185-220.

Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993; 5: 115-149.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003; 197: 1107-1117.

Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J*. 2005; 24: 1277-1286.

Gardella S, Andrei C, Costigliolo S, *et al*. Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T cells. *J Leukoc Biol*. 1999; 66: 237-241.

Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, *et al*. Expression of interleukin-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med*. 2002; 195: 245-257.

Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*. 2006; 176: 3717-3724.

Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, *et al*. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*. 1997; 386: 619-623.

Giles SS, Dagenais TRT, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77: 3491-3500.

Gordon S, Perry VH, Rabinowitz S, Chung LP, Rosen H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. *J Cell Sci*. 1988; Suppl 9: 1-26.

Gow NA, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, Walker L, Jansen T, Jacobs L, Tsoni V, Brown GD, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg BJ. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis*. 2007; 196: 1565-1571.

Gross O, Gewies A, Finger K, *et al*. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*. 2006; 442: 651-656.

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V *et al*. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*. 2009; 459: 433-436.

Helmby H, Takeda K, Akira S, *et al*. Interleukin-18 promotes the development of chronic gastrointestinal helminth infection by downregulating IL-13. *J Exp Med*. 2001; 194: 355-364.

Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, *et al*. *Aspergillus fumigates* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog*. 2005; 1: e30.

Hoshino T, Wiltout RH, Young HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol.* 1999; 162: 5070-5077.

Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists. *Infect Immun.* 2009; 77:1774-11781.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998; 391: 82-86.

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

Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, *et al.* IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells. *J Immunol.* 2000b; 165: 941-947.

Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, *et al.* Reduced host resistance and Th1 response to *Cryptococcus neoformans* in interleukin-18 deficient mice. *FEMS Microbiol Lett.* 2000a; 186: 121-126.

Kawakami K. Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother.* 2002; 25: S12-S19.

Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, Deleo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 467-478.

Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, *et al.* Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40. *J Immunol.* 2002; 169: 323-329.

Kokkinopoulos I; Jordan WJ, Ritter MA. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Molecular Immunol.* 2005; 42: 957-968.

Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, Jang MH, Saitoh T, Akira S, Kawai T. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal {beta}-glucan. *J Immunol.* 2009; 183: 8061-8067.

Lamkanfi M, Malireddi RKS, Kanneganti TD. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem.* 2009; 284: 20574-20581.

Lee JK, Kim SH, Lewis EC, *et al.* Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2004; 101: 8815-8820.

Leibundgut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007; 8: 630-638.

Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Pacilio M, *et al.* IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol.* 2001; 166: 945-951.

Linehan SA, Martínez-Pomares L, Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect.* 2000; 2: 279-288.

Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 368-381.

Marakalala MJ, Graham LM, Brown GD. The role of Syk/CARD9- coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin Dev Immunol.* 2010; 2010: 567-571.

Martinez, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43, 480.

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of toll-like receptor proteins. *Life Sciences.* 2000; 68: 241-258.

Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Curr Pharm Biotechnol*. 2000; 1: 235-251.

Mendes, RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton. CRC Press. 1994; p. 233-258.

Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton. CRC Press. 1994; 175-186.

Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peraçoli MT. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med Mycol*. 2011; 49: 694-703.

Nakamura K, Kinjo T, Saijo S, *et al*. Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Immunol*. 2007; 51: 1115-1119.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 423-474.

Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T *et al.* Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. J Clin Invest. 2006; 116: 1642-1650.

Netea MG, Vonk AG, van den Hoven, *et al.* Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. Eur J Immunol. 2003; 33: 3409-3417.

Ohman L, Maluszynska G, Magnusson KE, Stendahl O. Surface interactions between bacteria and phagocytic cells. Prog Drug Res. 1988; 32: 131-147.

Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. Nature. 1995; 378: 88-91.

Panagio LA, Tristao FS, Moreira AP, Pereira MS, Cavassani KA, Milanezi CM, Rossi MA, Silva JS. Role of interleukin (IL)-18 in experimental paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2008; 46: 435-442.

Peraçoli MTS, Parise-Fortes M, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. Rev Inst Med Trop. 1995; 37: 129-136.

Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE. Imunologia das infecções. Uberaba: FUNEPU. 1992; p.15-36.

Phadke AP, Mehrad B. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol*. 2005; 43: S173-176.

Qureshi MH, Zhang T, Koguchi Y, *et al*. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*. 1999; 29: 643-649.

Rajaram MV, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol*. 2010; 185: 929-942.

Reddy P. Interleukin-18: recent advances. *Curr Opin Hematol*. 2004; 11: 405-10.

Reid DM, Gow NAR, Brown GD: Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21: 30-37.

Restrepo A, and Tobón AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-3068.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium – to – yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984; 46: 346-353.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol.* 1999; 66: 733-739.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998; 391: 79-82.

Robinson D, Shibuya K, Mui A, *et al.* IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and Nfkapab. *Immunity.* 1997; 7: 571-581.

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol.* 2004; 42: 485-498.

Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, *et al.* Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C-type lectins. *Immunity.* 2005; 22: 507-517.

Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the *in vitro* antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine.* 2002; 18: 149-157.

Roy S, Dickerson R, Khanna S, Collard E, Gnyawali U, Gordillo GM, Sen CK.

Particulate β -glucan induces TNF- α production in wound macrophages via a redox-sensitive NF- κ B-dependent pathway. *Wound Repair Regen.* 2011; 19: 411-419.

Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM: *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One.* 2010; 5:10.

Saijo S, Fujikado N, Furuta T, *et al.* Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* 2007; 8: 39-46.

Saijo S, Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol.* 2011; 23: 467-472.

Shikanai-Yasuda, M.A., Telles Filho, F.e.Q., Mendes, R.P., Colombo, A.L. and Moretti, M.L. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39, 297-310.

Shiratsuchi H, Ellner JJ. Expression of IL-18 by *Mycobacterium avium*-infected human monocytes; association with *M. avium* virulence. *Clin Exp Immunol.* 2001; 123: 203-209.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the Genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology.* 1994; 140: 1189-1194.

Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS, Fernandez AC, Dias LA, Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandin on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol.* 2001; 102: 480-485.

Steele C, Marrero L, Swain S, *et al.* Alveolar macrophage mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 β -glucan receptor. *J Exp Med.* 2003; 198: 1677-1688.

Steele C, Rapaka RR, Metz A, *et al.* The β -glucan receptor Dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 2005; 1: e42.

Stuyt RJL, Netea MG, van Krieken JH, van der Meer JWM, Kullberg BJ. Recombinant interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1524-1527.

Sugawara I, Yamanda H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect Immun.* 1999; 67: 2585-2589.

Suram S, Brown GD, Ghosh M, Gordon S, Loper R, Taylor PR, Akira S, Uematsu S, Williams DL, Leslie CC: Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and Cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the β -glucan receptor. *J Biol Chem.* 2006; 281: 5506-5514.

Tardif F, Goulet JP, Zakrzewski A, Chauvin P, Rouabhia M. Involvement of interleukin-18 in the inflammatory response against oropharyngeal candidiasis. *Med Sci Monit.* 2004; 10: BR239-249.

Taylor PR, Brown GD, Reid DM, *et al.* The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002; 269: 3876-3882.

Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, *et al.* Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007; 8: 31-38.

Tsoni SV, Brown GD. Beta-glucans and dectin-1. *NY Acad Sci.* 2008; 1143: 45–60.

Underhill DM; Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 825-852.

van Bruggen R, Drewniak A, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Chapel H, Verhoeven AJ, Kuijpers TW. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. *Mol Immunol.* 2009; 47: 575-581.

van de Veerdonk FL, Wever PC, Hermans MH, Fijnheer R, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Schneeberger PM. IL-18 serum concentration is markedly elevated in

acute EBV infection and can serve as a marker for disease severity. *J Infect Dis.* 2012; 206:197-201.

Vautier S, MacCallum DM, Brown GD. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine.* 2012; 58:89-99.

Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun.* 2005; 73: 1553-1560.

Von Knethen A, Brüne B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by nitric oxide in monocytes/macrophages down-regulates p47phox and attenuates the respiratory burst. *J Immunol.* 2002; 169: 2619-2626.

Walsh TJ, 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: S165-172.

Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.* 2008; 16: 27-32.

Yoshimoto T, Min B, Sugimoto T, *et al.* Nonredundant roles for CD1d-restricted natural killer T cells and conventional CD4⁺ T cells in the induction of immunoglobulin E antibodies in response to interleukin-18 treatment of mice. *J Exp Med.* 2003; 197: 997-1005.

Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, *et al.* IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol.* 2000; 1: 132-137.

Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *Febs J.* 2005; 272: 6179-6217.