



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

Taiane Priscila Gardizani

**Avaliação da expressão de receptores celulares e da
produção de citocinas e eicosanoides por
neutrófilos humanos em resposta a glicoproteína
gp43 do *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2019

Taiane Priscila Gardizani

Avaliação da expressão de receptores celulares e
da produção de citocinas e eicosanoides por
neutrófilos humanos em resposta a glicoproteína
gp43 do *Paracoccidioides brasiliensis*

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gardizani, Taiane Priscila.

Avaliação da expressão de receptores celulares e da produção de citocinas e eicosanoides por neutrófilos humanos em resposta a glicoproteína gp43 do *Paracoccidioides brasiliensis* / Taiane Priscila Gardizani. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio
Capes: 40105008

1. Glicoproteínas. 2. Neutrófilos. 3. Receptores Toll-Like. 4. Citocinas. 5. Eicosanoides.

Palavras-chave: citocinas; eicosanoides; gp43; neutrófilos polimorfonucleares; receptores semelhantes a Toll.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infecciosos (LIAI) - Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, **Fátima e Nelson**, que não mediram esforços para me apoiar durante os anos de estudo, que não foram poucos. Vocês me ensinaram os valores da responsabilidade, respeito, honestidade e dignidade, o que contribuiu para minha formação pessoal e profissional. Tudo o que conquistei, devo a vocês!

Ao meu irmão, **Thiego**, lindeza da minha vida, amigo de todas as horas e grande incentivador. Agradeço a compreensão nos momentos de ausência e pelo carinho que sempre concedeu a mim. Obrigada pelo apoio e amor incondicional, e por sempre comemorar minhas conquistas.

Ao meu benção **Fernando**, que me enche de amor, carinho e felicidade. Obrigada por ser o melhor companheiro em todos os momentos, pela paciência e motivação nos dias difíceis. Dedico a você porque sei que sempre acreditou em mim. Obrigada por fazer parte da minha vida e ser essa pessoa maravilhosa. Amo você!

À minha grande família, **Tia Ana, Tio João Pedro, Janaína, Fernando Beretta, Angelina, Josiane, Bruno, Ronaldo, Tia Maria Luíza, Tio Berto, Jacqueline, Evandro, Joyce, Fernando Melo e Benício**. Obrigada pelos momentos juntos, vocês me trazem alegria e ajudam a recarregar as energias.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me dar forças, serenidade, sabedoria e esperança durante todo o trajeto da pós-graduação.

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio**, que me recebeu prontamente como sua aluna de doutorado. Passamos por um período desanimador e turbulento na pós-graduação, o que me fez pensar e repensar se a vida acadêmica ‘valeria a pena’. E olha só, onde chegamos. Foram muitos os ensinamentos, as conversas e conselhos. Certamente o que construímos ao longo desses anos foi muito além do profissional, uma verdadeira amizade pautada em sinceridade. Obrigada por confiar em mim e possibilitar a realização de um sonho. Agradeço, de coração, tudo o que fez por mim!

Aos **voluntários da pesquisa**, sem os quais o desenvolvimento do trabalho não seria possível.

Aos **colegas do LIAI** pela ajuda nos dias de experimento e na troca de conhecimentos e experiências. Agradeço em especial, a **Amanda Manoel Della Coletta**, com quem compartilhei intensamente o período da pós-graduação, pela amizade, companheirismo, pelas longas e intermináveis discussões científicas. Saiba que aprendi muito com você durante esses anos.

Aos **companheiros de trabalho da UNIPEX**, pessoas que passaram por minha vida e deixaram uma marca especial, tornando os dias na unidade mais alegres e leves.

À **Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva e seus alunos** por me receberem tão bem no laboratório de vocês, por permitirem o uso de equipamentos e me auxiliarem durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os **Professores do Departamento de Patologia da FMB – UNESP** pelos ensinamentos. Vocês não fazem ideia do quanto mudaram minha vida. Obrigada!

À **Profa. Dra. Rosana Puccia**, por gentilmente, nos doar a gp43.

À **Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares** pela doação de grande parte dos reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Aos **Funcionários do Departamento de Patologia e da UNIPEX (FMB – UNESP)**, agradeço a boa vontade em resolver todo e qualquer tipo de assunto quando solicitado.

À querida amiga **Helga**, que me recebeu tão bem em Botucatu e que tive o prazer de conviver por alguns anos da pós-graduação. Foi com você que compartilhei alegrias, tristezas e incertezas, e aprendi a dar valor aos pequenos detalhes. Amizade assim, não dá para esquecer ou ficar longe!

À **Nathalia**, minha querida *roomie*, por ser tão honesta e corajosa. O pouco que convivi com você foi o suficiente para te admirar.

À querida **Vânia do Amaral Soler**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, por ser sempre tão atenciosa, prestativa e competente.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP na pessoa do diretor **Prof. Dr. Pasqual Barretti**.

Ao curso de Pós-Graduação em Patologia, na pessoa da **Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva**.

À Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da FMB – UNESP na pessoa da **Profa. Dra. Célia Regina Nogueira**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos durante o doutorado.

“A força não provém da capacidade física. Provém de uma vontade indomável”.

– *Mahatma Gandhi* –

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, prevalente na América Latina, que tem por agentes etiológicos diferentes espécies de *Paracoccidioides*. Entre eles encontra-se o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), espécie composta por um complexo de agrupamentos geneticamente isolados, classificados como espécies filogenéticas: S1, PS2, PS3 e PS4. O *P. brasiliensis* possui distribuído pela parede fúngica e dentro de vesículas citoplasmáticas uma glicoproteína de 43KDa, a gp43. Esta molécula é considerada como o principal componente antigênico produzido e secretado pelo fungo, a qual é encontrada no soro de pacientes acometidos pela PCM e, está associada aos fatores de virulência e escape do patógeno. Sabendo disso, tornou-se extremamente importante a avaliação da interação dessa proteína com as células do sistema imune inato e sua consequente atuação sobre os mecanismos moduladores celulares. Assim, nosso estudo avaliou os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) que estão presentes em abundância desde o início e durante a infecção pelo *Paracoccidioides*, e que apresentam além de suas ações efectoras diretas contra o fungo, uma importante ação moduladora da resposta imune. Estas ações envolvem o reconhecimento do fungo por Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) que culminam em ativação celular com consequente produção e liberação de diferentes mediadores inflamatórios. Dessa maneira, o presente trabalho avaliou o envolvimento dos receptores celulares TLR2 e TLR4 no reconhecimento e na produção de citocinas e eicosanoides por PMNs humanos de indivíduos saudáveis estimulados com a gp43. As células foram inicialmente incubadas na presença ou ausência de anticorpos monoclonais anti-TLR2 e anti-TLR4, individualmente ou em conjunto, por 2h, a 37°C, em uma atmosfera de 5% CO₂, para o bloqueio dos receptores. Em seguida, os PMNs foram estimulados ou não com a gp43 (20ng/ml) por 4h, nas mesmas condições anteriormente citadas. A expressão de TLR2 e TLR4 bem como a detecção intracitoplasmática de IL-17A e IL-4 foram feitas por citometria de fluxo. Já a concentração de PGE₂, LTB₄, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α foi avaliada em sobrenadante de cultura por ELISA. Nossos resultados mostraram que a gp43 interage com TLR2 e TLR4, induzindo a liberação de PGE₂, mediada por TLR2, e IL-17A, via TLR4. Tais dados corroboram a ação da gp43 como um importante fator de virulência do *P. brasiliensis*, uma vez que estimulou os PMNs a produzirem PGE₂ e IL-17A, mediadores envolvidos na susceptibilidade do hospedeiro à infecção fúngica na PCM.

Palavras-chave: gp43, neutrófilos polimorfonucleares, TLR2, TLR4, citocinas, eicosanoides.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease, prevalent in Latin America and has as etiological agents *Paracoccidioides* spp. One of them is *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) composed by a complex of genetically isolated clusters, classified as phylogenetic species: S1, PS2, PS3 and PS4. *P. brasiliensis* present along the cell wall and inside cytoplasmic vesicles a 43 KDa glycoprotein, known as gp43. This molecule is recognized as the main antigenic component produced and secreted by the fungus into sera of PCM patients and is associated with the escape and virulence factors of the pathogen. Thereby, becomes extremely important to evaluate the interaction mechanisms of this protein with cells from the innate immune system and their consequent action on cellular functions. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) has prominent participation in PCM, once these cells are present in a great amount at the beginning and during *Paracoccidioides* infection. PMNs perform effector actions directly against the fungi as well as an important immune modulatory function. Such actions involve the recognition of fungal components by pattern recognition receptors (PRRs) that leads to cell activation and consequent production of inflammatory mediators. So, the present study evaluated the involvement of TLR2 and TLR4 on cytokines and eicosanoids release by PMNs from healthy human stimulated with gp43. Cells were initially incubated in the presence or absence of monoclonal antibodies anti-TLR2 and anti-TLR4, individually or in combination, for 2h, at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere, for receptor blockage. PMNs were then stimulated or not with gp43 (20 ng/ml) during 4h, at the same conditions. The expression of TLR2 and TLR4 as well the intracytoplasmic detection of IL-17A and IL-4 were done by flow cytometry. The concentration of PGE₂, LTB₄, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α was measured in cultures supernatants by ELISA. Our results showed that gp43 interacts with TLR2 and TLR4 as also induced the release of PGE₂ via TLR2 and the production of IL-17A through TLR4. Therefore, our data corroborate the gp43 action as the main virulence factor of *P. brasiliensis*, once it stimulated PMNs to release PGE₂ and IL-17A, which are inflammatory mediators responsible to enhance the host susceptibility to the fungal infection in PCM.

Keywords: gp43, polymorphonuclear neutrophils, TLR2, TLR4, cytokines, eicosanoids.

SUMÁRIO

1. **Revisão de Literatura**..... 15

Referências 25

2. **Artigo Científico** 32

Abstract..... 33

Introduction 34

Materials and Methodos..... 35

Results..... 37

Discussion..... 45

Conclusion 47

References..... 47

3. **Conclusão** 51

4. **Apêndices**..... 53

5. **Anexo** 57

1. Revisão de Literatura

1. REVISÃO DE LITERATURA

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica, considerada importante causa de morbidade e mortalidade principalmente em indivíduos que trabalham ou vivem em áreas rurais (MARTINEZ, 2015). Desnutrição, má higiene, tabagismo e consumo de álcool são considerados fatores de risco para a manifestação da doença (SILVA-VERGARA et al., 2000). A PCM é endêmica na América Latina, especialmente em países como Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina. Tem como agentes etiológicos o *Paracoccidioides brasiliensis* (espécies crípticas S1, PS2, PS3 e PS4) e o *Paracoccidioides lutzii* (MATUTE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009; MUNHOZ et al., 2016). Recentemente, foi proposta uma nova nomenclatura para essas quatro diferentes espécies crípticas: S1 (*Paracoccidioides brasiliensis*), PS2 (*Paracoccidioides americana*), PS3 (*Paracoccidioides restrepiensis*), PS4 (*Paracoccidioides venezuelensis*) e o *Paracoccidioides lutzii*, já classificado anteriormente (TURISSINI et al., 2017). Esses fungos são termodimórficos, ou seja, se apresentam sob a forma de micélio à temperatura ambiente (abaixo de 25°C), podendo ser encontrados no solo, água e vegetação, ou então na forma de levedura (acima de 35°C), quando em cultivo ou infectando o hospedeiro (RESTREPO; TOBÓN, 2005; MARQUES, 2013).

O contágio do hospedeiro ocorre frequentemente pela inalação de conídios e propágulos micelianos infectantes, que se instalam nos bronquíolos e alvéolos pulmonares e se transformam em leveduras patogênicas, devido à temperatura corpórea humana. Lesões pulmonares focais e linfadenomegalia hilar caracterizam o complexo primário pulmonar (FRANCO, 1987; NETO et al., 2014). A partir deste momento, a infecção pode evoluir para a cura espontânea ou tornar-se latente caracterizando a PCM-infecção, sem apresentação de sinais ou sintomas clínicos, podendo ser evidenciada pela positividade do teste intradérmico com paracoccidioidina (OLIVEIRA et al., 2002). No entanto, a infecção pode progredir e disseminar-se para outros órgãos como fígado, baço, glândulas adrenais, pele, membranas mucosas e linfonodos pela via linfo-hematogênica dando origem a PCM-doença (FRANCO et al., 1993), a qual pode se manifestar clinicamente sob a forma aguda/subaguda ou crônica. A forma aguda/subaguda acomete indivíduos jovens de ambos os sexos e é considerada a mais grave, por progredir rapidamente e comprometer o sistema fagocítico mononuclear. Já a crônica é observada predominantemente em homens adultos (acima de 30 anos), os quais apresentam quadro clínico de duração prolongada com lesões localizadas (unifocal) ou disseminadas em mais de um órgão ou sistema (multifocal) (FRANCO et al., 1993). A PCM também apresenta a forma residual ou de sequela, na qual os pacientes apresentam manifestações clínicas

decorrentes de alterações anatômicas e funcionais causadas pelas cicatrizes que seguem o tratamento da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

As manifestações clínicas de indivíduos acometidos com a PCM podem envolver tosse seca ou produtiva, seguida de dispneia. O acometimento pulmonar, geralmente apresenta um padrão obstrutivo e pode ser confirmado por exames de imagem que mostram infiltrado reticulonodular, geralmente nos dois terços inferiores dos pulmões e áreas radiotransparentes nos ápices. Os tecidos da mucosa oral, faríngea e laríngea estão envolvidos em grande parte dos pacientes adultos e geralmente é caracterizado por dor e limitação funcional. A apresentação clínica clássica é uma úlcera superficial com aspecto granuloso e pontos hemorrágicos, conhecida como estomatite moriforme. A ulceração e a infiltração grosseira do tecido ocorrem quando os lábios estão envolvidos, resultando em macroqueilia. A maioria dos pacientes apresenta múltiplas lesões orais, acometendo principalmente gengiva, palato, lábios, mucosa bucal e/ou língua. A laringe está frequentemente envolvida e a disfonia é um sinal comum. As mucosas ocular e genital são raramente acometidas, e quando presentes, tem apresentação clínica semelhante à observada na mucosa oral. A PCM frequentemente acomete a pele, sendo o rosto um local comum para as lesões, particularmente ao redor da boca e nariz. Essas lesões podem evoluir para macroqueilia, ulcerar ou eventualmente envolver o lábio superior, com progressão para o vestíbulo nasal e assoalho do nariz. As lesões nos membros inferiores geralmente estão localizadas nos pés, apresentando na região plantar lesões ulceradas com bordas hiperqueratóticas. O padrão mais comum de lesão cutânea é uma úlcera, seguida de uma lesão infiltrativa. As lesões de pele originadas de linfonodos doentes refletem o predomínio de uma resposta imune exsudativa, com infiltração da cápsula linfonodal e da pele, seguida de formação de fístula e drenagem do material purulento, vindo a cicatrizar espontaneamente (MARQUES, 2012; MARQUES, 2013). Assim, a PCM apresenta um grande impacto social nas áreas de maior endemismo, não só pelo número considerável de casos, mas também pela cronicidade da doença, longa duração do tratamento e sequelas frequentes que causam incapacidade para o trabalho e má qualidade de vida (MARTINEZ, 2015).

A capacidade de desenvolver uma resposta imune adequada contra as espécies de *Paracoccidioides* vem sendo elucidada através de estudos clínicos e experimentais, nos quais a interação entre o fungo e o sistema imune do hospedeiro é evidenciada através dos mecanismos inatos e adaptativos de defesa. Inicialmente foi proposto que a resistência ao *P. brasiliensis* seria mediada predominantemente por um padrão de resposta tipo Th1 e que a susceptibilidade envolveria a participação da resposta tipo Th2 (FRANCO et al., 1993; MUSATTI et al., 1994; PERAÇOLI et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2002). No entanto, De Castro e colaboradores

(2013) propuseram um novo modelo que explica os distintos padrões de resposta imune observados nas formas clínicas da PCM. Esse estudo traz novas informações, que complementam e corroboram os dados da literatura demonstrando que, a PCM-infecção é caracterizada predominantemente por uma resposta Th1, com aumento dos níveis de interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), responsáveis pela ativação de macrófagos e cruciais na resistência ao fungo, e redução dos níveis de interleucinas-4, -5 e -10 (IL-4, IL-5 e IL-10). Já, a PCM aguda/subaguda, a forma mais grave da doença, é caracterizada por um padrão de resposta imune predominante do tipo Th2/Th9, com aumento dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, fator transformador de crescimento-beta ($\text{TGF-}\beta$), IL-9 e IL-21, sendo IL-4 e IL-9 responsáveis pela indução da produção de anticorpos IgG4 e IgE pelas células B, e IL-5 responsável pela eosinofilia presente na forma clínica. A PCM crônica apresenta um padrão de resposta imune mista, com predomínio de células Th17 e Th22, com importante participação de células Th1. Apresenta níveis elevados de IL-12 e produção de IL-17, com indução de resistência parcial. No entanto, ocorre também uma resposta inflamatória exacerbada com a indução de danos teciduais e fibrose, geralmente observados nesses indivíduos (DE CASTRO et al., 2013).

O *P. brasiliensis*, um dos agentes etiológicos mais estudado da PCM, sintetiza em seu citoplasma uma glicoproteína de 43KDa, a gp43, que é armazenada em vesículas e posteriormente transportada até a parede celular, a qual é liberada extracelularmente (PUCCIA et al., 1986; SANDOVAL et al., 1996). Assim é reconhecido o componente antigênico mais secretado pelo fungo, sendo identificado no soro de pacientes acometidos pela PCM (MENDES-GIANNINI et al., 1989; CAMARGO et al., 1991; DA SILVA et al., 2004). Essa glicoproteína também é capaz de ser reconhecida e induzir uma resposta imune celular de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) em pacientes e animais infectados com o fungo, semelhante àquela induzida pelo antígeno de Fava Netto, com o intuito de detectar a exposição prévia ao microrganismo ou diagnosticar a PCM (SARAIVA et al., 1996).

Estudos tem mostrado que essa glicoproteína favorece a adesão do fungo aos componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente a laminina, e a consequente invasão e instalação fúngica nos tecidos. De acordo com o estudo experimental de Vicentini e colaboradores (1994), quando leveduras de *P. brasiliensis* foram revestidas com laminina e então inoculadas em testículos de hamster, houve um aumento da virulência do fungo resultando em uma doença granulomatosa mais rápida e severa (VICENTINI et al., 1994). Outro importante papel da gp43 está relacionado a sua capacidade em induzir a sinalização de apoptose em células epiteliais pulmonares, o que favorece a sobrevivência e replicação local do

fungo (SILVA et al., 2015). Estudos experimentais mostraram também que a glicoproteína inibe, de maneira significativa, a fagocitose do fungo por macrófagos murinos e a consequente liberação de óxido nítrico (NO), um importante fator microbicida, propiciando assim, a instalação da infecção primária em hospedeiros susceptíveis (ALMEIDA; UNTERKIRCHER; CAMARGO, 1998; POPI et al., 2002). Ainda, foi relatado que a gp43 e seus peptídeos P4 e P23 são capazes de modular a resposta imune inflamatória local e sistêmica, inicialmente com predomínio na liberação de IL-10, citocina anti-inflamatória, considerada como não-protetora na PCM, o que favorece a sobrevivência do fungo no hospedeiro (KONNO et al., 2012). De maneira geral, todos esses fatores estão relacionados a instalação, disseminação e sobrevivência do fungo no hospedeiro. Corroborando esses dados, o bloqueio da gp43 em leveduras de *P. brasiliensis* e a consequente inoculação em camundongos, levou a uma diminuição na habilidade de aderência do fungo aos componentes celulares do hospedeiro, resultando em uma infecção menos severa (GESZTESI et al., 1996). Episódio parecido foi observado, quando leveduras de *P. brasiliensis* foram geneticamente modificadas e tiveram a gp43 inibida (PbGP43). Esse estudo demonstrou uma redução da carga fúngica nos pulmões de camundongos infectados com esta cepa modificada, provavelmente devido a uma resposta imune mediada por níveis reduzidos de IL-10 e IL-6 e aumento TNF- α e INF- γ (TORRES et al., 2013). Portanto, devido à sua ação na interação do patógeno com o hospedeiro, a gp43 representa um dos importantes fatores de virulência das espécies de *Paracoccidioides*.

Dessa forma, torna-se extremamente interessante avaliar os mecanismos de interação da gp43 com as células do sistema imune e sua consequente ação sobre as funções celulares. Dentre as células da resposta imune inata, estudos tem destacado o envolvimento dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), que apresentam uma participação dinâmica durante toda a infecção na PCM. O estágio inicial da doença é caracterizado por uma infiltração massiva de PMNs no local da lesão, os quais permanecem na fase crônica da micose originando regiões supurativas de granulomas (SILVA; ALVES; FIGUEIREDO, 1994). Além das ações efectoras diretas contra o fungo através da fagocitose, degranulação enzimática, explosão respiratória ou pela liberação de redes extracelulares, as NETs (*Neutrophil Extracellular Traps* – redes extracelulares de neutrófilos), os PMNs também desempenham importante ação moduladora da resposta imune (PHILLIPSON; KUBES, 2011; AMULIC et al., 2012; DELLA COLETTA et al., 2015; MEJIA et al., 2015; BACHIEGA et al. 2016; GAZENDAM et al., 2016).

Para que os mecanismos celulares de defesa sejam disparados é necessário que ocorra, inicialmente, o reconhecimento do agente infeccioso pela célula. Diferentes patógenos

apresentam estruturas superficiais ou intracelulares exclusivas, chamadas de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em diversos tipos de células como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, dentre outras (CHEN; DIPIETRO, 2017). Estruturas evolutivas altamente conservadas presentes na parede das células fúngicas como β -glucanas, quitina e mananas são essenciais para o crescimento e sobrevivência dos fungos. Tais componentes estruturais são PAMPs fúngicos, os quais são reconhecidos pelos PRRs presentes nas células da imunidade inata (GAZENDAM et al., 2016). Entre os PRRs descritos na literatura, os que aparecem mais relacionados ao reconhecimento e ligação fúngica, estão os receptores semelhantes a Toll (TLRs) e, os receptores da família das lectinas do tipo C como o Receptor de Manose (MR) e as Dectinas (MORESCO; AVINE; BEUTLER, 2011; MARAKALALA; NDLOVU, 2017).

Vários estudos demonstraram a participação de diferentes PRRs no reconhecimento do *P. brasiliensis* como TLR2, TLR4, TLR9, MR, Dectina-1 e Dectina-2, os quais podem atuar de maneira colaborativa propiciando mecanismos de resistência ou susceptibilidade à infecção fúngica (JIMÉNEZ et al., 2006; POPI et al., 2002; CALICH et al., 2008b; LOURES et al., 2009; BONFIM et al., 2009; ACORCI-VALÉRIO et al., 2010; BACHIEGA et al., 2016; VIERA et al., 2017; ROMAGNOLO et al., 2017; QUAGLIA E SILVA et al., 2019).

Os membros da família TLR são glicoproteínas do tipo I integradas à membrana que contém repetições ricas em leucinas envoltas por motivos conservados ricos em cisteína em suas regiões extracelulares, que estão envolvidas na interação com o ligante e, que também possuem um domínio único de receptor citoplasmático Toll/interleucina-1 (TIR), homólogo ao domínio intracelular dos receptores da família IL-1, que é essencial à sinalização. Nos mamíferos, foram identificados 13 membros da família TLR capazes de detectar patógenos invasores bem como aqueles localizados intracelularmente. Entre os TLRs expressos na superfície das células temos os TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11, enquanto que os TLR3, 7, 8, 9, 12 e 13 estão presentes nas membranas de compartimentos intracelulares, como o retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos ou endolisossomos (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; MORESCO; AVINE; BEUTLER, 2011; CHEN; DIPIETRO, 2017). Após a ligação do microrganismo ao receptor, a ativação celular progride através de duas vias de sinalização: uma dependente de MyD88 e outra independente de MyD88, também conhecida como via dependente do domínio TIR que contém adaptador que induz IFN- β (TRIF). A primeira resulta na indução do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-

κ B), com consequente produção de citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e MIP2, bem como a produção de moléculas co-estimulatórias específicas e moléculas de adesão. A via TRIF resulta na ativação do NF- κ B e dos fatores reguladores de interferon (IRF), que por sua vez conduzem à expressão de citocinas inflamatórias e genes IFN do tipo I, respectivamente (CHEN; DIPIETRO, 2017). A liberação de tais mediadores possibilita a modulação da resposta imune inata como também é responsável por instruir a resposta imune adaptativa.

Estudos conduzidos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a importância da participação dos TLRs, entre eles TLR2 e TLR4, no reconhecimento do *P. brasiliensis* e a consequente modulação da resposta imune do hospedeiro através da produção de diferentes mediadores inflamatórios (RODRIGUES et al., 2007; CALICH et al., 2008a; CALICH et al., 2008b; LOURES et al., 2009; BONFIM et al., 2009; ACORCI et al., 2009; ACORCI-VALÉRIO et al., 2010).

Macrófagos derivados de camundongos nocautes para TLR2 e deficientes para TLR4 apresentaram menor habilidade fagocítica quando comparados àqueles de camundongos selvagens (WT), além de secretarem baixos níveis de NO, IL-12 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (CALICH et al., 2008b; LOURES et al., 2009). A ausência de TLR4, possibilitou a produção de níveis equivalentes de TNF- α aos macrófagos oriundos de animais WT, no entanto, sintetizaram quantidades mais elevadas de IL-10, citocina não-protetora na PCM (CALICH et al., 2008b). Quando *in vivo*, os camundongos nocautes para TLR2 com infecção pulmonar por *P. brasiliensis* apresentaram cargas fúngicas inferiores aos camundongos WT devido a prevalente ativação da imunidade Th17, inflamação exacerbada contendo alto número de PMNs e presença diminuída de células T reguladoras (Tregs). Estes dados demonstram que a resposta inflamatória exacerbada dos hospedeiros à infecção por *P. brasiliensis* é tão prejudicial quanto o crescimento fúngico não controlado por ausência ou ativação inadequada da imunidade. Também foi avaliada a participação da molécula MyD88 frente a infecção com o *P. brasiliensis*. Macrófagos e camundongos nocautes para MyD88 mostraram uma diminuição da capacidade fungicida, paralela à diminuição da síntese de NO e IL-12, e menor tempo médio de sobrevivência em relação aos WT, respectivamente (CALICH et al., 2008b). Em conjunto, os dados evidenciaram que a ausência da molécula MyD88 causa efeitos negativos profundos na ativação celular, resultando em uma infecção mais grave, enquanto TLR2 e TLR4 parecem estar envolvidos nos mecanismos de virulência, uma vez que o fungo utiliza estes receptores para infectar as células hospedeiras (CALICH et al., 2008a).

Em relação aos monócitos e neutrófilos humanos foi demonstrado que o reconhecimento, internalização e ativação celular envolveram a participação dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 em resposta a duas cepas de *P. brasiliensis* (Pb265 e Pb18) (BONFIM et al., 2009). O reconhecimento da cepa de baixa virulência 265 ocorreu de maneira preferencial por TLR-2 e Dectin-1, o que resultou em uma produção balanceada de IL-10 e TNF- α , que protege o hospedeiro da destruição tecidual e, ao mesmo tempo, conduz uma resposta imune protetora contra o fungo. O que confirma o papel dubio do TLR2 na PCM, uma vez que após o reconhecimento celular, este receptor pode direcionar a resposta imune tanto para um perfil anti- como pró-inflamatório (BONFIM et al., 2009).

Acorci-Valério e colaboradores (2010) verificaram que a ativação de neutrófilos humanos com as citocinas IL-15, TNF- α , Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) ou IFN- γ , seguido do desafio com a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18), foram capazes de aumentar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4. Todas as citocinas aumentaram a atividade fungicida bem como a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) dos neutrófilos, mas este processo não foi associado aos receptores. Em compensação, TLR2 e principalmente TLR4 foram envolvidos na produção de IL-8 e IL-10, uma vez que o *P. brasiliensis* faz uso desse receptor para ganhar acesso aos neutrófilos, retardar sua morte e induzir um perfil anti-inflamatório de resposta imune, favorável para sua sobrevivência. Portanto, a interação de neutrófilos com o fungo via TLR4 é considerada como um dos mecanismos patogênicos de escape na PCM (RODRIGUES et al., 2007; ACORCI et al., 2009; ACORCI-VALÉRIO et al., 2010).

Além das citocinas, vem sendo avaliado o envolvimento de PRRs na liberação de eicosanoides, também considerados potentes modulares da resposta imune.

Os eicosanoides são formados a partir da ativação do ácido araquidônico (AA), que pode ser liberado a partir de fosfolipídios de membrana após a catálise pela enzima fosfolipase A2 (PLA2). Sua metabolização, gera diferentes tipos eicosanoides biologicamente ativos devido a ação de três grupos separados de enzimas como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e o citocromo P450 (CYP). A enzima LOX catalisa leucotrienos (LTs), entre eles o leucotrieno B4 (LTB₄), que atua principalmente em neutrófilos e eosinófilos, mas também em mastócitos e células endoteliais. O LTB₄ estimula a fagocitose, liberação de enzimas lisossômicas e defensinas, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), como também promove a adesão às células endoteliais e a transmigração, amplificando as respostas inflamatórias, além do seu importante papel na quimiotaxia (WOO et al., 2002; BRANDT; SEREZANI, 2017). Tais ações envolvidas na ativação e regulação da

atividade microbicida de fagócitos sugerem a importância dos LTs na proteção do hospedeiro contra diferentes agentes infecciosos (BRANDT; SEREZANI, 2017). Embora o recrutamento de leucócitos induzidos por LTB₄ também esteja relacionado com a patogênese de algumas doenças inflamatórias (WOO et al., 2002). Já a enzima COX, a mais popular, apresenta duas isoformas a COX1 (constitutiva) e a COX2 (induzida). Embora tenham estrutura e função parecidas, a COX2 utiliza o AA endógeno enquanto a COX1 utiliza o AA derivado de fontes externas como a da alimentação (SANDER et al., 2017). A COX catalisa a formação de tromboxano (TX) e prostaglandinas (PG). A produção de prostaglandina 2 (PGE₂), a mais abundante, por células eucarióticas humanas, foi relatada como mediadora de vários fenômenos biológicos, como nos casos de homeostase, inflamação, dor e tumorigênese. Além disso, pesquisas recentes revelaram que fungos patogênicos também tem a capacidade de induzir a liberação de PGE₂ (LIU et al., 2016; BORDON et al., 2007b). Dentre os leucócitos, os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) são uma importante fonte de PGE₂. Este mediador mostrou suprimir a resposta imune inata, diminuindo as funções de granulócitos e macrófagos alveolares, bem como suprimir a função efetora citolítica de células NK (KALINSK, 2012). A PGE₂ também é um poderoso supressor durante a resposta imune adaptativa. Seu efeito pode ser direto na proliferação de células T, já que inibe a produção de IL-2 e a expressão do seu receptor como também desvia o equilíbrio da resposta Th1 para Th2, regulando a produção de IFN- γ , mas não das citocinas IL-4 e IL-5 (KALINSK, 2012).

Alguns estudos foram conduzidos com o intuito de entender a função dos eicosanoides na infecção por *P. brasiliensis* (SOARES et al., 2001; BORDON et al., 2007a; BORDON et al., 2007b; BIONDO et al., 2010; BIONDO et al., 2012; TRISTÃO et al., 2013; SARGI et al., 2013). Em relação a produção de PGE₂, foi relatado o envolvimento dos receptores TLR2, MR e Dectina-1 após neutrófilos e monócitos humanos serem incubados com leveduras de *P. brasiliensis* (BONFIM et al., 2009; BALDERRAMAS et al., 2013). Por conseguinte, este mediador apresentou um papel deletério para os indivíduos infectados com *P. brasiliensis*. Um estudo de PCM murina demonstrou que a inibição deste mediador produziu um efeito imunossupressor nos estágios iniciais da infecção, por um mecanismo dependente de IL-10 e IL-4, com consequente redução no tamanho dos granulomas presentes no fígado e nos pulmões, levando a uma doença menos severa (MICHELIN et al. 2002). Estudos *in vitro* também evidenciaram o efeito negativo da PGE₂. Quando monócitos humanos tiveram a produção de PGE₂ inibida por indometacina, um inibidor de COX, a liberação de TNF- α , embora em baixas concentrações, foi capaz de ativar as células, aumentando sua capacidade fungicida pela liberação de H₂O₂ (SOARES et al., 2001). Outro estudo, ainda avaliando o papel

de monócitos humanos após a interação com o fungo, constatou que mesmo após a ativação das células com IFN- γ , os níveis de H₂O₂ e de TNF- α apresentavam-se baixos. Tais dados demonstraram que o *P. brasiliensis* consegue escapar da atividade das células fagocíticas à partir da indução da produção de PGE₂, que diminuiria a resposta das células ao fungo (BORDON et al., 2007a). Visto que o fungo utiliza a PGE₂ para sua sobrevivência, foi investigado se ele próprio seria capaz de induzir a produção deste mediador lipídico. De acordo com o estudo de Bordon e colaboradores (2007b), foi identificado a produção de PGE₂ pelo *P. brasiliensis*, e após sua incubação com indometacina, identificou-se também uma redução significativa na produção deste mediador, bem como da viabilidade fúngica (BORDON et al., 2007b). Estudo adicional mostrou que o *P. brasiliensis* produz PGE₂ usando tanto substratos endógenos como exógenos, os quais são críticos para a viabilidade do fungo (BIONDO et al., 2010). No entanto, um estudo observou que o *P. brasiliensis* é capaz de inibir a produção de PGE₂ por células dendríticas imaturas, levando a níveis não detectados de IL-12p70 e produção inadequada de TNF- α , mediadores essenciais para o amadurecimento fenotípico dessas células. Tais resultados indicam que existe um mecanismo de evasão do *P. brasiliensis* associado a desregulação na maturação das DCs (FERNANDES et al., 2015). Ainda, foi avaliado o papel da ingestão do ácido α -linoleico (LNA), um potente anti-inflamatório natural, após a infecção de camundongos com *P. brasiliensis* (SARGI et al., 2013). O grupo suplementado apresentou uma diminuição nos níveis séricos de PGE₂ e ao mesmo tempo, foi observado um aumento na síntese de NO por macrófagos peritoneais, demonstrando, portanto, o efeito regulador do LNA na resposta imune frente a PCM (SARGI et al., 2013).

Em relação aos LTs, foi visto que o fungo também apresenta a capacidade de produzir elevados níveis de LTB₄, o que de acordo com Biondo e colaboradores (2012) possivelmente contribui para os mecanismos de virulência do fungo (BIONDO et al., 2012). No entanto, estudos experimentais murinos de PCM evidenciaram que tanto a enzima 5-lipoxigenase como o LTB₄ apresentam um papel protetor para o hospedeiro, com redução das cargas fúngicas pulmonares, associado ao recrutamento e ativação de células fagocíticas para a produção de citocinas ativadoras como IFN- γ e IL-12, como também para a substância microbida, NO (TRISTÃO et al., 2013; BALDERRAMAS et al., 2013). Ainda, de acordo com Balderramas e colaboradores (2014), os PMNs humanos foram capazes de liberar LTB₄, principalmente quando as células foram co-incubadas com leveduras de *P. brasiliensis*. No entanto, nenhum dos receptores avaliados, como TLR2, MR e Dectina-1, foram envolvidos na produção deste mediador lipídico (BALDERRAMAS et al., 2014).

Como vimos, grande parte dos trabalhos na literatura avaliaram as consequências da interação dos PMNs com a levedura ou micélio do *P. brasiliensis*. Até o momento, não há estudo que avalie a interação dessas células com a gp43, importante imunógeno produzido e secretado pelo fungo, associado aos fatores de virulência e escape do patógeno. Apenas um trabalho avaliou o papel de monócitos humanos após o estímulo com a gp43. Este evidenciou que o reconhecimento da glicoproteína pode ocorrer via TLR4, o qual aparece associado a produção elevada de TNF- α ou então através de TLR2, que foi associado a elevada produção de IL-10 (NAKAIRA-TAKAHAGI et al., 2011). Dessa maneira, nos propusemos a avaliar a participação dos receptores TLR2 e TLR4 de PMNs humanos no reconhecimento da gp43 e a consequente produção e liberação de diferentes mediadores inflamatórios como citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ e TNF- α) e eicosanóides (PGE₂ e LTB₄).

REFERÊNCIAS

- ACORCI MJ, DIAS-MELICIO LA, DE ASSIS GOLIM M, BORDON-GRACIANI AP, PERAÇOLI MTS, DE CAMPOS SOARES AM. Inhibition of Human Neutrophil Apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of Interleukin-8. Scand J Immunol. 2009; 69(2):73-9.
- ACORCI-VALÉRIO MJ, BORDON-GRACIANI AP, DIAS-MELICIO LA, DE ASSIS GOLIM M, NAKAIRA-TAKAHAGI E, DE CAMPOS SOARES AM. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. Scand J Immunol. 2010; 71(2):99-108.
- ALMEIDA SR, UNTERKIRCHER CS, CAMARGO ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. Med. Mycol. 1998; 36:405-411.
- AMULIC B, CAZALET C, HAYES GL, METZLER KD, ZYCHLINSKY A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu Rev Immunol. 2012; 30:459-89.
- BACHIEGA TF, DIAS-MELICIO LA, FERNANDES RK, DE ALMEIDA BALDERRAMAS H, RODRIGUES DR, XIMENES VF, et al. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. Immunobiology. 2016; 1(2):228-35.
- BALDERRAMAS HA, PENITENTI M, RODRIGUES DR, BACHIEGA TF, FERNANDES RK, IKOMA MR, et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. Cytokine. 2014; 67(1):36-43.
- BALDERRAMAS HA, RIBEIRO OG, SOARES AM, OLIVEIRA SL. The role of leukotriene B4 in early stages of experimental paracoccidioidomycosis induced in phenotypically selected mouse strains. Med Mycol. 2013; 51(6):625-34.

BIONDO GA, DIAS-MELICIO LA, BORDON-GRACIANI AP, ACORCI-VALÉRIO MJ, SOARES AM. *Paracoccidioides brasiliensis* endogenous and exogenous arachidonic acid for PGEx production. *Mycopathologia*. 2010; 170(2):123-30.

BIONDO GA, DIAS-MELICIO LA, BORDON-GRACIANI AP, KUOKAWA CS, DE CAMPOS SOARES AM. Production of leukotriene B4 by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 2012; 29(6):201-8.

BONFIM CV, MAMONI RL, BLOTTA MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2009; 47(7):722-33.

BORDON AP, DIAS-MELICIO LA, ACORCI MJ, BIONDO GA, FECCHIO D, PERAÇOLI MT, DE CAMPOS SOARES AM. Prostaglandin E(2) production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 2007b; 163(3):129-35.

BORDON AP, DIAS-MELICIO LA, ACORCI MJ, CALVI SA, SERRÃO PERAÇOLI MT, VICTORIANO DE CAMPOS SOARES AM. Prostaglandin E2 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect*. 2007a; 9(6):744-7.

BRANDT SL, SEREZANI CH. Too much of a good thing: How modulating LTB4 actions restore host defense in homeostasis or disease. *Semin Immunol*. 2017; 33:37-43.

CALICH VLG, DA COSTA TA, FELONATO M, ARRUDA C, BERNARDINO S, LOURES FV, *et al*. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. 2008a; 165(4-5):223-36.

CALICH VLG, 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*. 2008b; 53(1):1-7.

CAMARGO ZP, TABORDA CP, RODRIGUES EG, TRAVASSOS LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol*. 1991;29(1):31-8.

CHEN L, DIPIETRO LA. Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2017; 6(10):344-355.

DA SILVA SHM, QUEIROZ-TELLES F, COLOMBO AL, BLOTTA MHS, LOPES JD, DE CAMARGO ZP. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(6): 2419–2424.

DE CASTRO LF, FERREIRA MC, DA SILVA RM, BLOTTA MH, LONGHI LN, MAMONI RL. Characterization of the immune response in human Paracoccidioidomycosis. *J Infect*. 2013; 67(5):470-85.

DELLA COLETTA AM, BACHIEGA TF, DE QUAGLIA E SILVA JC, SOARES ÂM, DE FAVERI J, MARQUES SA, *et al*. Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of

NETs Generation In Vitro. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 1;9(9):e0004037. doi: 10.1371/journal.pntd.0004037.

FERNANDES RK, BACHIEGA TF, RODRIGUES DR, GOLIM MDE A, DIAS-MELICIO LA, BALDERRAMAS HDE A, et al. Correction: *Paracoccidioides brasiliensis* Interferes on Dendritic Cells Maturation by Inhibiting PGE2 Production. PLoS One. 2015; 10(6):e0131380. doi: 10.1371/journal.pone.0131380.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 1987; 25(1):5-18.

FRANCO M, PERACOLI MT, SOARES A, MONTENEGRO R, MENDES RP, MEIRA DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol. 1993; 5:115-49.

GAZENDAM RP, VAN DE GEER A, ROOS D, VAN DEN BERG TK, KUIJPERS TW. How neutrophils kill fungi. Immunol Rev. 2016; 273(1):299-311.

GESZTESI JL, PUCCIA R, TRAVASSOS LR, VICENTINI AP, DE MORAES JZ, FRANCO MF, et al. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. Hybridoma. 1996; 15(6):415-22.

JIMÉNEZ MDEL P, RESTREPO A, RADZIOCH D, CANO LE, GARCÍA LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 47(1):56-66.

KALINSKI P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol. 2012; 188(1):21-8.

KONNO FT, MARICATO J, KONNO AY, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response", Microbes and Infect. 2012; 14(6):517-27.

KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 388(4):621-5.

LIU X, WANG D, YU C, LI T, LIU JL, SUN S. Potential Antifungal Targets against a Candida Biofilm Based on an Enzyme in the Arachidonic Acid Cascade—A Review. Front. Microbiol. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01925>

LOURES FV, PINA A, FELONATO M, CALICH VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. J Immunol. 2009; 183(2):1279-90.

MARAKALALA MJ, NDLOVU H. Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. PLoS Pathog. 2017; 13(6):e1006333.

MARQUES, SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. *An Bras Dermatol.* 2013; 88(5):700-11.

MARQUES SA. Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol*, 2012; 30(6):610-15.

MARTINEZ R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57 (19):11-20. doi: 10.1590/S0036-46652015000700004.

MATUTE DR, MCEWEN JG, PUCCIA R, MONTES BA, SAN-BLAS G, BAGAGLI E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*, 2006; 23(1):65-73.

MEJIA SP, CANO LE, LÓPEZ JA, HERNANDEZ O, GONZÁLEZ Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*, 2015. doi: 10.1099/mic.0.000059.

MENDES-GIANNINI MJ, BUENO JP, SHIKANAI-YASUDA MA, FERREIRA AW, MASUDA A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(12): 2842–2845.

MICHELIN MA, FIGUEIREDO F, CUNHA FQ. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Parasitol.* 2002; 102(3-4):170-7.

MORESCO EM, LAVINE D, BEUTLER B. Toll-like receptors. *Curr Biol.* 2011; 21(13):R488-93. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.039.

MUNHOZ JF, FARRER RA, DESJARDINS CA, GALLO JE, SYKES S, SAKTHIKUMAR S, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere.* 2016; 1(5): e00213-16.

MUSATTI CC, REZKALLAH-IWASSO MT, MENDES E, MENDES NF. Cell-mediated immunity in patients with Paracoccidioidomycosis. In: Fanco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis. Flórida, USA. Boca Raton:CRC Press. 1994; 175-86.

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(7):694-703.

NETO BRS, CARVALHO PZ, BAILÃO AM, MARTINS WS, SOARES CMA, PEREIRA M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. *BMC Genomics.* 2014; 15(254):1-15.

OLIVEIRA SJ, MAMONI RL, MUSATTI CC, PAPAORDANOU PM, BLOTTA MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4(2):139-44.

PERAÇOLI MT, FORTES MR, DA SILVA MF, MONTENEGRO MR. Natural killer cell activity in experimental Paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995; 37(2):129-36.

PERAÇOLI, MTS, SOARES, AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta, C. E. Imunologia das infecções. Uberaba, MG. FUNEPU. 1992; 15-36.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. Nat Med. 2011; 17(11):1381-90.

POPI FAF, LOPES JD, MARIANO M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol. 2002; 218(1-2):87-94.

PUCCIA R, SCHENKMAN S, GORIN PA, TRAVASSOS LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. Infect Immun. 1986; 53(1): 199–206.

QUAGLIA E SILVA JC, DELLA COLETTA AM, GARDIZANI TP, ROMAGNOLI GG, KANENO R, DIAS-MELICIO LA. Involvement of the Dectin-1 Receptor upon the Effector Mechanisms of Human Phagocytic Cells against *Paracoccidioides brasiliensis*. J Immunol Res. 2019; e:1529189.

RESTREPO A, SALAZAR ME, CANO LE, STOVER EP, FELDMAN D, STEVENS DA. Estrogens inhibits mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. Infect Immun. 1984; 46(2):346-53.

RESTREPO, A.; TOBÓN, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E.; Dollin, R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, ESA. Elsevier. 2005; 3062-8.

RODRIGUES DR, DIAS-MELICIO LA, CALVI SA, PERAÇOLI MT, SOARES AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol. 2007; 45(1):27-33.

ROMAGNOLO AG, DE QUAGLIA E SILVA JC, DELLA COLETTA AM, GARDIZANI TP, MARTINS ATL, ROMAGNOLI GG, et al. Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycoses. 2017. doi: 10.1111/myc.12725. [Epub ahead of print]

SANDER WJ, O'NEILL HG, POHL CH. Prostaglandin E2 As a Modulator of Viral Infections. Front. Physiol. 2017. 8:89. doi: 10.3389/fphys.2017.00089

SANDOVAL MP, DEL NEGRO GB, MENDES-GIANNINI MJS, BRITO T. Distribution of exoantigens and 43 kDa glycoprotein (gp43) in yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Mycol. Med. 1996; 6:1–6.

SARAIVA EC, ALTEMANI A, FRANCO MF, UNTERKIRCHER CS, CAMARGO ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. J Med Vet Mycol. 1996; 34(3):155-61.

SARGI SC, DALALIO MM, MORAES AG, VISENTAINER JE, MORAIS DR, VISENTAINER JV. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the production of prostaglandin E2 and nitric oxide during experimental murine paracoccidioidomycosis. Biomed Res Int. 2013; 2013:947687.

SHIKANAI-YASUDA MA, MENDES RP, COLOMBO AL, TELLES FQ, KONO A, PANIAGO AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2017; 50(4):1-26.

SILVA JF, VICENTIM J, OLIVEIRA HC, et al. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(4):476-84.

SILVA-VERGARA ML, MARTINEZ R, CAMARGO ZP, MALTA MH, MAFFEI CM, CHADU, JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. Med. Mycol. 2000; 38(3):193-99.

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 (Pt5):1189-94.

SOARES AM, CALVI SA, PERAÇOLI MT, FERNANDEZ AC, DIAS LA, DOS ANJOS AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunology. 2001; 102(4):480-5.

TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010; 140(6):805-20.

TEIXEIRA MM, THEODORO RC, DE CARVALHO MJ, FERNANDES L, PAES HC, HAHN RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phylogenet Evol, 2009; 52(2):273-83.

TORRES I, HERNANDEZ O, TAMAYO D, MUÑOZ JF, LEITÃO NP JR, GARCÍA AM, et al. Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One. 2013; 8(7):e68434. doi: 10.1371/journal.pone.0068434.

TRISTÃO FS, ROCHA FA, MOREIRA AP, CUNHA FQ, ROSSI MA, SILVA JS. 5-Lipoxygenase activity increases susceptibility to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Infect Immun. 2013; 81(4):1256-66.

TURISSINI DA, GOMEZ OM, TEIXEIRA MM, MCEWEN JG, MATUTE DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. Fungal Genet Biol. 2017; 106:9-25.

VIEIRA IF, FERNANDES RK, RODRIGUES DR, GORGULHO CM, KANENO R, SOARES AMVC. TLR9 stimulation induces increase in fungicidal activity of human dendritic cells challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. Med. Mycol. 2017; 56(7):911-915.

VICENTINI AP, GESZTESI JL, FRANCO MF, DE SOUZA W, DE MORAES JZ, TRAVASSOS LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect Immun. 1994; 62(4): 1465–1469.

WOO CH, YOU HJ, CHO SH, EOM YW, CHUN JS, YOO YJ, KIM JH. Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. J Biol Chem. 2002; 277(10):8572-8.

2. *Artigo Científico*

Redigido de acordo com as normas da revista *Journal of Immunology Research*

Journal of Immunology Research

Research Article

43kDa glycoprotein (gp43) from *Paracoccidioides brasiliensis* induced the production of IL-17A and PGE2 by human polymorphonuclear neutrophils: involvement of TLR2 and TLR4

Taiane Priscila Gardizani¹, Amanda Manoel Della Coletta¹, Graziela Goreti Romagnoli², Rosana Puccia³, Ângela Maria Victoriano de Campos Soares², Luciane Alarcão Dias-Melicio^{1,4}.

- 1- Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, Unipex - Experimental Research Unity, Medical School of Botucatu (FMB), São Paulo State University (Unesp), Av. Professor Montenegro, s/n, Distrito de Rubião Júnior, 18618-687, Botucatu, São Paulo, Brazil.
- 2- Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences (IB), São Paulo State University (Unesp), Av. Professor Montenegro, s/n, Distrito de Rubião Júnior, 18618-687, Botucatu, São Paulo, Brazil.
- 3- Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Paulista Medical School - Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), Rua Botucatu, 862, 04023062, São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 4- Department of Pathology, Medical School of Botucatu (FMB), São Paulo State University (Unesp), Av. Professor Montenegro, s/n, Distrito de Rubião Júnior, 18618-687, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Correspondence should be addressed to Luciane Alarcão Dias-Melicio; dias.melicio@unesp.br.

Abstract

Gp43 glycoprotein is the major immunogenic constituent of *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), one of the etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM) and is associated with fungus virulence factors. The present study evaluated gp43 interaction with TLR2 and

TLR4 of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from healthy volunteers and consequent modulation of the immune response through the production and release of cytokines and eicosanoids. PMNs were incubated in the absence or presence of monoclonal antibodies anti-TLR2 and anti-TLR4, individually or in combination, prior to the addition of gp43. Then, PMNs were analyzed for expression of both surface receptors and detection of intracytoplasmic IL-17A and IL-4 using flow cytometry, while the production of PGE₂, LTB₄, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α was evaluated in cultures supernatants by ELISA. Our results showed that gp43 increases the percentage of PMNs expressing TLR2 and TLR4, and the release of PGE₂ occurred through TLR2 and the intracytoplasmic expression of IL-17A via TLR4. Thus, our data suggest that the escape mechanism of *P. brasiliensis* from PMN could be mediated via gp43, through the release of PGE₂ and IL-17A, which enhance the host susceptibility to the fungal infection.

Keywords: gp43, polymorphonuclear neutrophils, Toll-like receptors, cytokines, eicosanoids.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease, prevalent in Latin America and has as etiological agents *Paracoccidioides* spp., thermo-dimorphic fungi, being *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), the most studied pathogen [1-5]. PCM infection initiates through inhalation of the fungus mycelium propagules reaching the pulmonary alveoli, and there, the fungus transform itself in a multi-budding yeast due the body temperature [6,7]. The disease establishment, progression and severity depend on fungi virulence factors as well as host immunological response. In relation to virulence factors, *P. brasiliensis* exhibits inside their cytoplasm and along the cell wall a 43KDa glycoprotein (gp43) considered as the main antigenic released on serum of PCM patients [8-10]. Gp43 is associated with the fungus virulence due to its adhesive properties, induction of cell apoptosis, besides modulation of local and systemic inflammatory response, which may propitiate the fungal installation and spread in host tissue [11-17]. The inhibition of gp43 expression in genetically modified *P. brasiliensis* (PbGP43) and its use in experimentally infected mice resulted in a less severe infection due to diminishing adherence of the fungi to host cells proteins, yeast cell phagocytosis, and consequently the action of proteases responsible for fungal tissue penetration [18]. The first cells recruited to the infection sites are polymorphonuclear neutrophils (PMNs), which remain

in the lesion forming suppurative granulomas in the chronic phase of PCM [19,20]. The effector and modulatory mechanisms of PMNs are initiated by the recognition of conserved structures presented on microorganism, denominated pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are recognized by different cell receptors, the pattern-recognition receptors (PRRs) [21,22]. Among PRRs involved in fungus recognition are the Toll-like receptors (TLRs), a family of single-pass type I transmembrane-spanning proteins [23]. After TLRs bind to fungal structures, cell signaling pathway can be triggered provoking a modulation of the innate immune response as well instructing the adaptive immunity by the release of cytokines and eicosanoids [24-30]. Studies showed the participation of TLR2 and TLR4 from PMNs in *P. brasiliensis* recognition and consequent modulation of the immune response against the fungus through the release of TNF- α , IL-8, IL-12, IL-10, prostaglandin E₂ (PGE₂) and leukotriene (LTB₄) [24,26,27,29-31]. Most studies evaluated the effects of PMNs interactions with *P. brasiliensis* yeast or mycelium and, until now, there are no studies aiming to assess the recognition and activation of PMNs with gp43, the fungus immunodominant antigen. Thus, the present study evaluated whether gp43 can interact with TLR2 and TLR4 on the surface of human PMNs and consequently modulate the immune response through the production of cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- γ and TNF- α) and eicosanoids (PGE₂ and LTB₄).

2. Materials and Methods

2.1. *Subjects*. Heparinized venous blood was obtained from 10 healthy adult donors (3 men, 7 women), with age range 19 to 37 years, after informed consent signature. This study was approved by the Research Ethics Committee from Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp) (CAAE number: 80098817.8.0000.5411).

2.2. *Isolation of peripheral blood polymorphonuclear neutrophils*. Each volunteer donated 40ml of blood which was layered above density gradients as Histopaque 1119g/mL followed by Histopaque 1083g/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and centrifuged at 405g, for 30min, at room temperature. The interface layer of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were collected, erythrocytes were lysed with 0,1% NaCl and cell viability was assessed with trypan blue dye (95% viability). PMNs were then resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and 1%

gentamicin (Cultilab – Campinas, São Paulo, BRA; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA and Schering-Plough, São Paulo, São Paulo, BRA, respectively) and adjusted to 2×10^6 cells/ml for 96-well plates and 1×10^6 cells/ml for 48-well plates. Microcultures were intended to evaluate the expression of the receptors and the intracytoplasmic cytokines, whereas macro cultures were used in the cytokine and eicosanoids assays.

2.3. *Obtention of gp43 glycoprotein from Paracoccidioides brasiliensis.* Gp43 was isolated and purified from *P. brasiliensis* (Pb339 strain) culture supernatants by affinity chromatography. Affi-Gel 10 columns bound to Mab17c, an anti-gp43 monoclonal antibody that recognizes all gp43 isoforms, was used as previously described [11].

2.4. *TLR2 and TLR4 expression and blockage of the receptor.* PMNs were initially treated or not with monoclonal antibodies anti-human TLR2 ($0,8 \mu\text{g}/10^5$ cells) (Biolegend, San Diego, CA, USA) and mouse anti-human TLR4 ($2 \mu\text{g}/10^5$ cells) (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA), individually or in combination, for 2h, in a 5% CO₂ atmosphere, at 37°C. After the receptors blockade, cells were incubated in presence of gp43 (20 ng/ml) or in absence (control culture) during 4 hours at the same conditions described above. Supernatants were collected, centrifuged and stored at -20°C for measuring IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , PGE₂ and LTB₄ levels. PMNs were then incubated with PerCP anti-human CD16 antibody, FITC anti-human CD282 (TLR2) antibody (both antibodies from BioLegend, San Diego, CA, USA) and PE mouse anti-human TLR4 antibody (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA), for 20 minutes, at 4°C, in the dark. Receptors expression was determined by FACSCanto II flow cytometry (BD, San Diego, CA, USA) using the FACSDiva software. The standard acquisition was set to 25,000 events and cells were gated based in size (Forward-Scattered – FSC), granularity (Side-Scattered – SSC) and fluorescence parameters (PerCP-CD16⁺ and/or FITC-TLR2⁺ and/or PE-TLR4⁺). Data were analyzed with FLOWJo software.

2.5. *Intracytoplasmic detection of IL-4 and IL-17A by flow cytometry.* After the receptors blockade, PMNs were incubated with gp43 (20 ng/ml) or LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) as a positive control (data not shown) and, at the same time, with brefeldin A (5mg/ml, BioLegend, San Diego, CA), for 4h, to intracytoplasmic cytokine detection. After that, cells were incubated with PerCP anti-human CD16 antibody, for 20min, at 4°C. Then, cells were centrifuged, supernatant was carefully removed, and cell pellets were resuspended in 100 μl of reagent

A from the Fix&Perm kit (Nordic MUBio, Susteren, The Netherlands) and incubated at 4°C, during 15min. Suspension were centrifuged, supernatants removed, and cells were incubated with 100µl of reagent B from Fix&Perm kit in the presence of PE Mouse Anti-Human IL-4 or PE Mouse Anti-Human IL-17A antibody (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ), individually, for 30min, at 4°C. At the end, cells were centrifuged to remove supernatant, and resuspended in 100µl of fixing solution. All steps were performed in the dark in order to protect cells from light exposure. The intracytoplasmic expression of IL-4 and IL-17A was determine by FACSCanto II flow cytometry, using FACSDiva software. The standard acquisition was set to 30,000 events and cells were gated based in size (Forward-Scattered – FSC), granularity (Side-Scattered – SSC) and fluorescence parameters (PerCP-CD16⁺ and PE-IL-4⁺ or PE-IL-17A⁺). Data were analyzed with FLOWJo software.

2.6. *Determination of cytokines and eicosanoids in cultures supernatant.* Concentrations of IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ and TNF-α were detected using Human IL-6, IL-10, IL-12 and TNF-α ELISA Sets (BD OptEIA™, BD, San Diego, CA, USA) and IFN-γ by DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). PGE₂ and LTB₄ levels were measured using a competitive ELISA kit from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). All assay types were conducted according to the manufacturer's protocol.

2.7. *Statistical analysis.* Results were analyzed using GraphPad Prism Software Inc (San Diego, CA, USA), and the significance level was set at <0.05. Non-parametric data were presented as median and analyzed using the Friedman's test followed by the post-test of multiple Dunn comparisons. Parametric data were expressed as mean ± SD and analyzed by Analysis of One-Way Variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison post-test. Shapiro-Wilk was the normality test used.

3. Results

3.1. *Expression of TLR2 and TLR4 after PMNs stimulation with gp43.* The percentage of PMNs expressing TLR2 was detected after incubation with gp43 by flow cytometry. When cells had their TLR2 blocked with monoclonal antibody anti-TLR2 and were cultured in the absence of gp43, a decrease in PMNs percentage expressing TLR2 was identified, which

was further diminished when gp43 was added in PMN culture. The number of PMNs expressing TLR2 also declined when both receptors, TLR2 and TLR4, were blocked and then incubated with the glycoprotein (Figure 1A).

The percentage of PMNs expressing TLR4 at the cell surface was also evaluated and detected when cells were stimulated with gp43. As expected, the blockage of TLR4 decreased the receptor expression, however when these blockaded cells were co-incubated with the glycoprotein the expression of TLR4 increased (Figure 1B).

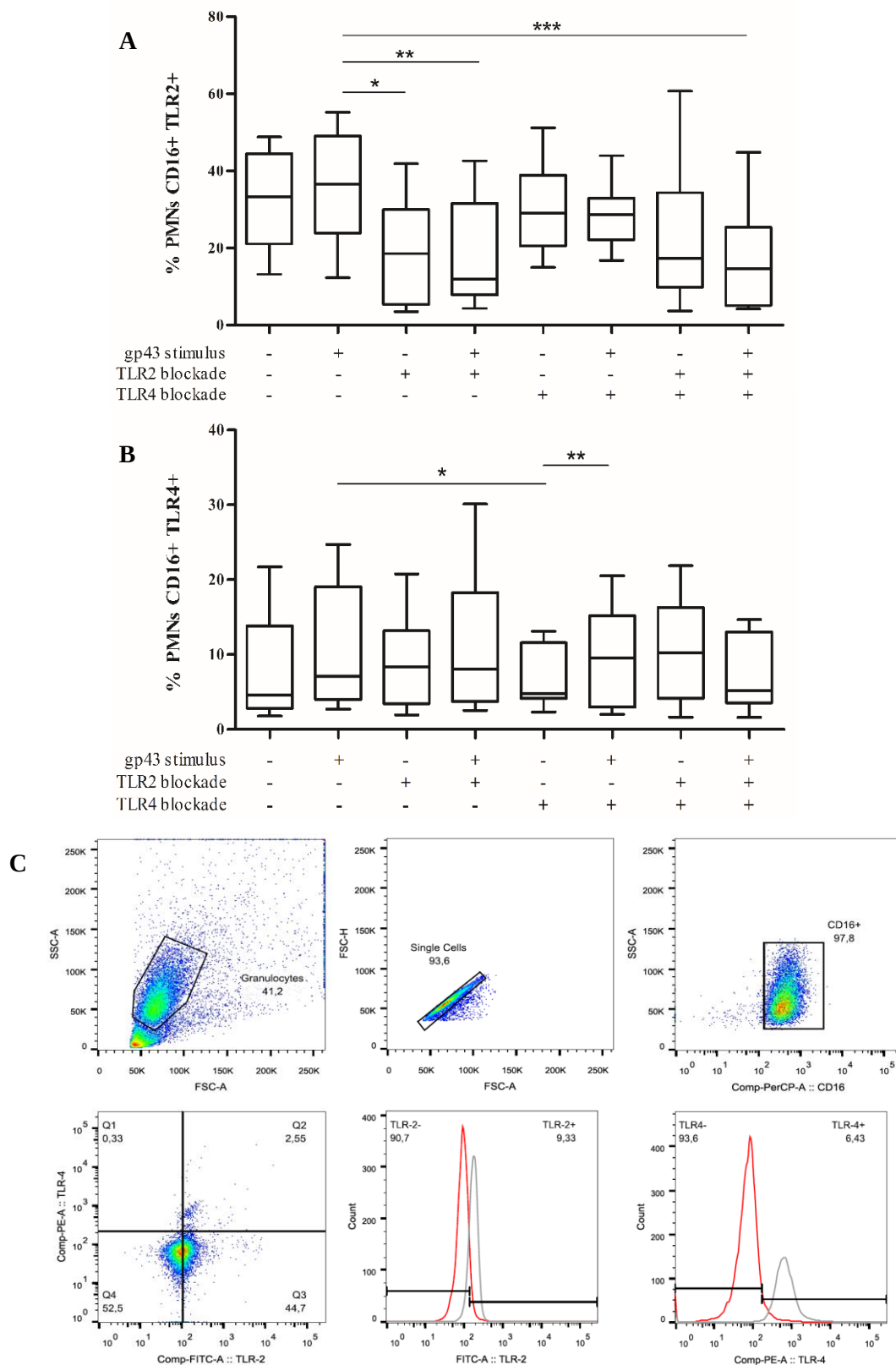


Figure 1: Percentage of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) CD16 positive (+) expressing TLR2 (A) and TLR4 (B). PMNs were incubated in the absence (control culture) or presence of gp43 (20 ng/ml), for 4h, at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. After that, PMNs were analyzed using flow cytometry. Results are presented as percentage of PMNs expressing TLR2 and TLR4, box-and-whiskers (min to max) graphs, considering $p < 0.05$.

Statistically significant differences between groups are indicated as follow: (A) when comparing to the PMN+gp43; *PMN TLR2 blockade; **PMN TLR2 blockade+gp43; ***PMN TLR2 and TLR4 blockade+gp43; (B) *PMN+gp43 vs. PMN TLR4 blockade; ** PMN TLR4 blockade vs PMN TLR4 blockade+gp43. (C) Representative experiment showing the expression of PMN (control culture) CD16 PerCP+, TLR2 FITC+ and TLR4 PE+ and histograms displaying the percentage of TLR2 and TLR4 blockade (red line) and remaining positive receptors expression (gray lines).

3.2. *Role of TLR2 and TLR4 in PGE₂ and LTB₄ production by PMNs incubated with gp43.* Our results showed that the production of PGE₂ involved the participation of TLR4. PMNs incubated or not with gp43 were able to produce PGE₂. However, when PMNs had their TLR4 blocked, the levels of PGE₂ substantially declined even when the gp43 was added in culture. The blockage of TLR2 and TLR4 at the same time, also conducted to low levels of PGE₂, corroborating the participation of TLR4, since only TLR2 blockage did not change the production of this eicosanoid (Figure 2A). Regarding LTB₄ production, PMNs were able to produce this inflammatory mediator independently of cell stimulation and receptor blockage. Therefore, gp43 does not influence the production of this eicosanoid as well as TLR2 and TLR4 are not involved in the LTB₄ production (Figure 2B).

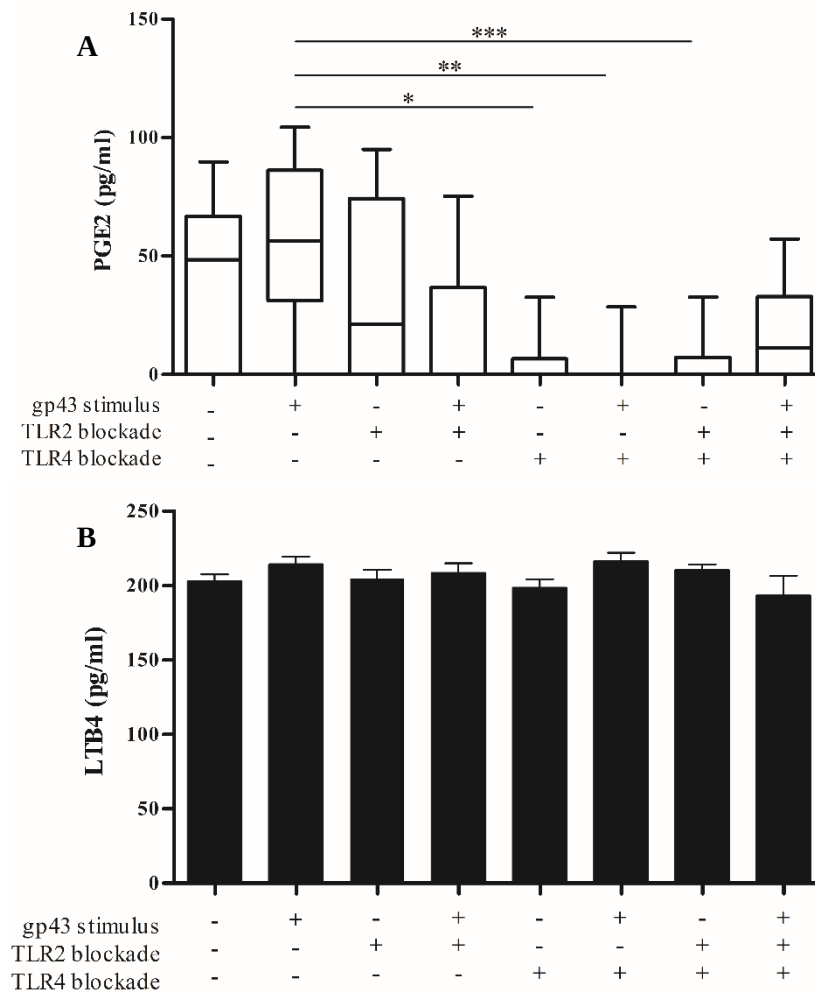


Figure 2: Involvement of TLR2 and TLR4 in PGE₂ (A) and LTB₄ (B) production by human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) stimulated with gp43 from *P. brasiliensis*. Cells were incubated in the absence or presence of anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies, individually or in combination, for 2h, at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere for receptors blockade. PMNs were then stimulated or not with gp43 (20 ng/ml) during 4h, at the same conditions. Eicosanoids concentration (pg/ml) were detected by competitive ELISA in the culture supernatants. Results are expressed as box-and-whiskers (min to max) graph, considering $p < 0.05$ (A) or mean $\pm$ SD (B), considering $p < 0.05$. (A) Statistically significant differences between groups are indicated as follow when comparing to the PMN+gp43: *PMN TLR4 blockade; **PMN TLR4 blockade+gp43; ***PMN TLR2 and TLR4 blockade. (B) No statistically significant differences were detected among the groups.

3.3. Role of TLR2 and TLR4 in IL-17A and IL-4 intracytoplasmic detection in PMNs stimulated with gp43. Our data demonstrated that the production of IL-17A involved mostly the participation of TLR2. This cytokine was detected inside PMNs co-incubated or not with gp43. When PMNs had their TLR4 blocked and were stimulated with gp43, the percentage of cells expressing IL-17A increased, demonstrating the interaction via TLR2 with the glycoprotein, once this receptor was free to bind gp43. Unstimulated cells blocked for TLR4

were also capable to express IL-17 when compared to cells blocked for the same receptor and stimulated with gp43, probably this condition favored TLR2 binding to the glycoprotein.

Regarding IL-4 production, independently of stimulation with gp43 and the receptors blockage, PMNs were capable to produce such cytokine. However, some groups presented a great variability of results, which did not allow the identification of statistical differences among them (Figure 3B).

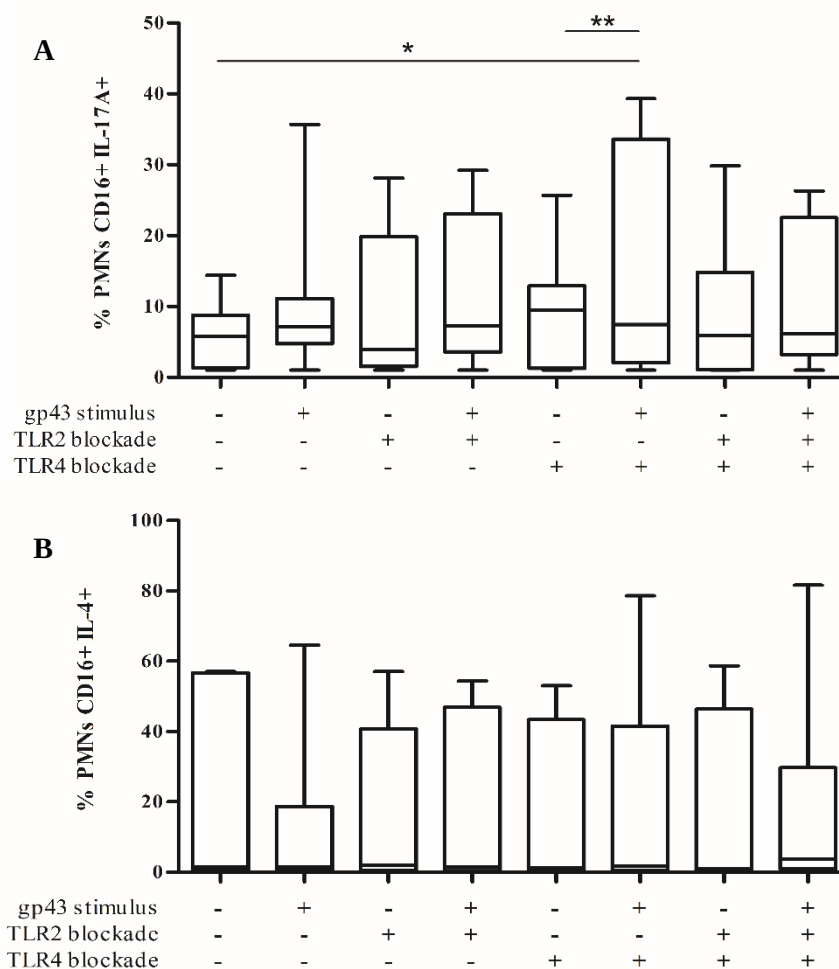


Figure 3: Percentage of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) CD16 positive (+) producing intracytoplasmic IL-17A (A) and IL-4 (B) after stimulation or not with gp43 from *P. brasiliensis* and the involvement of TLR2 and TLR4. Cells were incubated in the absence or presence of anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies, individually or in combination, for 2h, at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere for receptors blockage. PMNs were then stimulated or not with gp43 (20 ng/ml) during 4h, at the same conditions. After that, cells were analyzed by flow cytometry. Results are presented as percentage of PMNs expressing IL-17A (A) and IL-4 (B), box-and-whiskers (min to max) graphs, considering p<0.05. (A) Statistically significant differences between groups are indicated as follow: *PMN vs PMN TLR4 blockade+gp43; **PMN TLR4 blockade vs PMN TLR4 blockade+gp43. (B) No statistically significant differences were detected among the groups.

3.4. *Role of TLR2 and TLR4 in IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α production by PMNs incubated with gp43.* Our results demonstrated that gp43 was not able to induce any of the following evaluated cytokines: IL-6 (Fig. 4A), IL-10 (Fig. 4B), IL-12 (Fig. 4C), IFN- γ (Fig. 4D) and TNF- α (Fig. 4E) after the incubation period of 4h. The data regarding the production of IL-6, IL-12 and TNF- α showed great variability among individual samples, while IL-10 and IFN- γ production were not detected in these samples, regardless of the presence or absence of gp43 and receptors blockage (Figure 4).

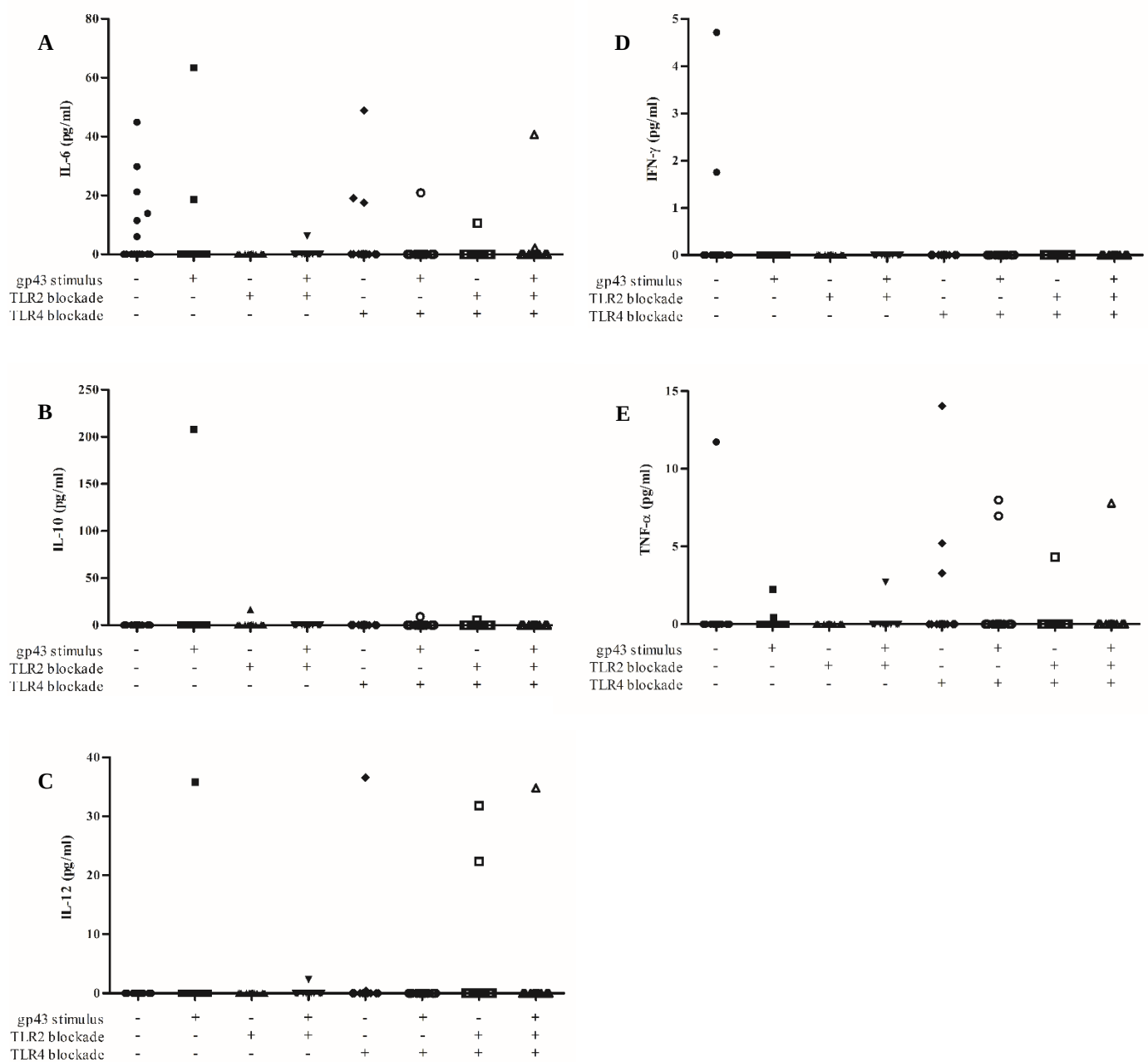


Figure 4: Involvement of TLR2 and TLR4 in the production of IL-6 (A), IL-10 (B), IL-12 (C), IFN- γ (D) and TNF- α (E) by human polymorphonuclear neutrophils (PMN) stimulated or not with gp43 from *P. brasiliensis*.

Cells were incubated in the absence or presence of anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies, individually or in combination, for 2h, at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere for receptors blockage. PMNs were then stimulated or not with gp43 (20 ng/ml) during 4h, at the same conditions. Cytokines concentration (pg/ml) were detected in supernatants culture without cells. Results are expressed as median, considering $p < 0.05$. No statistically significant differences were detected among the groups.

4. Discussion

Studies evaluating the role of PMNs in PCM have increased in the last few years, once these cells are present in great amounts at the beginning and during the fungal infection. To date, studies focusing on direct effector mechanisms and modulatory role of PMNs were conducted against yeast or mycelium of *P. brasiliensis*. However, there are no studies related to assessing the interaction of PMNs with gp43, the main immunodominant antigen of this fungus. In this context, we aimed to evaluate gp43 ability in modulating the expression of TLR2 and TLR4 on PMNs of healthy volunteers and the subsequent release of IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , PGE₂ and LTB₄.

Our data showed that when PMNs were exposed to gp43 had a slight enhancement in their percentage expressing TLR2 and TLR4, which means that the glycoprotein is one of the fungus virulence factors responsible for activating PMNs. According to literature, the recognition of *P. brasiliensis* yeasts by PMNs involves different cell surface receptors as dectin-1, mannose receptor (MR), TLR2 or TLR4, which act in a collaborative manner to provide mechanisms of resistance or susceptibility to fungal infection, in the dependence of the receptor used. [24,26,27,30].

In our study, we also detected that PMNs produced significant levels of PGE₂ and LTB₄. Regarding LTB₄, PMNs were able to produce considerable amounts independently of gp43 stimulation or TLR2 and TLR4 involvement. This result corroborates the study of Balderramas *et al.* (2014), which showed that PMNs also released this lipid mediator, mainly when cells were co-incubated with *P. brasiliensis* yeasts and none of these two receptors was involved LTB₄ production [30]. Contrariwise LTB₄ results, our data showed that gp43 induced PGE₂ production mainly by TLR4 stimulation, once the blockage of this receptor led to a substantial decrease in this eicosanoid production. As seen in other studies, PMNs were capable to produce PGE₂ in response to *P. brasiliensis* yeasts with the involvement of TLR2, MR and dectin-1 receptors [26,30]. PGE₂ production seemed to have a deleterious role for hosts infected with *P. brasiliensis*. In murine PCM, PGE₂ inhibition had an immunosuppressive effect at early steps of infection, by a mechanism dependent on IL-10 and IL-4 as well as was verified a reduction in the size of granuloma in liver and lungs [32]. In addition, monocytes had their fungicidal activity improved through hydrogen peroxide and TNF- α production when PGE₂ was inhibited by indomethacin [33,34]. Moreover, studies showed that *P. brasiliensis* yeasts can synthesize prostaglandins, being this lipid mediator required for fungi survival [35,36]. Nevertheless, a

study related the capacity of *P. brasiliensis* on interfere on dendritic cells maturation by inhibiting PGE₂ production, leading to no detected levels of IL-12p70 and an inadequate production of TNF- α [37]. Thus, gp43 is one of the *Paracoccidioides* components responsible to induce the release of this lipid mediator via TLR4, down-regulating host immune response. In accordance, *P. brasiliensis* uses TLR4 to infect human neutrophils and to guarantee its own multiplication through IL-10 and IL-8 production [27]. However, contrary to PMNs response, the recognition of *P. brasiliensis* by TLR4 from macrophages is related to develop more severe PCM in the experimental disease model [24].

In this study, we have also identified PMNs producing intracytoplasmic IL-17A after gp43 stimulation via TLR2. Our research group already showed that monocytes from healthy individuals produced IL-17A after incubation with *P. brasiliensis* yeasts, with Dectin-1 participation [38]. However, until this moment, IL-17A production by PMNs co-incubated with yeasts or other components of *P. brasiliensis* had not been reported. Despite the controversial ability of neutrophils to produce this cytokine, our study detected the intracytoplasmic IL-17A expression in PMNs, stimulated with gp43, by flow cytometry. According to PCM pathogenesis, the most severe form of the disease is characterized by a predominant Th17/Th22 response, along with substantial participation of Th1 cells [39]. Although high levels of IL-12 and IL-17 induce partial resistance to fungal infection, an exacerbated inflammatory response is also observed, with the induction of tissue damage and fibrosis [39-41]. As PMNs are observed in all stages of PCM lesions, the production of IL-17A by these gp43-stimulated cells could contribute to intensify the immune response. As seen for TLR4, *P. brasiliensis* also used TLR2 to access human neutrophils and murine macrophages, as a virulence mechanism [25,27]. Loures *et al.* (2009) showed TLR2 negatively regulates the pathogenic Th17 immunity deviating the T cell responses to a balanced Th1/Th2 response modulated by Tregs [25]. In our study, gp43 was able to stimulate PMNs to produce IL-17A via TLR2, which probably induces unrestrained inflammatory reactions.

Regarding other cytokines production, our study showed that gp43 did not stimulate PMNs to produce IL-4 or release IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α in a significant manner in the period evaluated (4h). Despite that, Balderramas *et al.* reported the production of IL-12 and IL-10 by human PMNs after 4h of stimulation with *P. brasiliensis* yeasts [30], indicating that other fungal components, acting alone or in synergy, may be involved in the stimulation of such cytokines. It is well known that *P. brasiliensis* induces the production of these cytokines modulating the immune response [27, 30, 31, 39], however, according to our data, gp43 seems not to stimulate PMNs to produce these cytokines shortly after 4h of incubation.

This is new and important knowledge about PCM immune response, demonstrating that the recognition of gp43 by PMNs occurred via TLR2 and TLR4 consequently stimulating PGE₂ and IL-17A production, which highlight the use of the glycoprotein by fungi to escape from the host defense mechanisms.

5. Conclusion

Taken together, our data reinforce the escape mechanism of *P. brasiliensis* via gp43 from the host defense mechanisms, once it is recognized by TLR2 and TLR4 and induces the release of PGE₂ and IL-17A by PMNs, respectively. These cells are the first to arrive at the infection site, in great amount, and remain there during the chronic fungal infection. Both PGE₂ and IL-17A are inflammatory mediators responsible for enhancing the host susceptibility to the fungal infection in PCM.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Funding Statement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Data Availability Statement

All relevant data are within the paper and its supporting information files.

References

- [1] A. Restrepo, A. M. Tobón, “*Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E.; Dollin, R. Principles and Practice of Infectious Diseases”. Philadelphia, ESA. Elsevier, 3062-8, 2005.
- [2] D. R. Matute, J. G. McEwen, R. Puccia, et al., “Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies”, *Molecular Biology and Evolution*, vol. 23, no. 1, pp. 65-73, 2006.

- [3] M. M. Teixeira, R. C. Theodoro, M. J. de Carvalho, et al., "Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 52, no. 2, pp. 273-83, 2009.
- [4] S. A. Marques, "Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment updating", *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 88, no. 5, pp. 700-11, 2013.
- [5] R. Martinez, "Epidemiology of Paracoccidioidomycosis", *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 57, no 19, pp. 11-20, 2015.
- [6] M. Franco, "Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis", *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, vol. 25, no. 1, pp. 5-18, 1987.
- [7] B. R. S. Neto, P. Z. Carvalho, A. M. Bailão, et al., "Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole", *BMC Genomics*, vol. 15, no. 254, pp. 1-15, 2014.
- [8] R. Puccia, S. Schenkman, P. A. Gorin, L. R. Travassos, "Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen", *Infection and Immunity*, vol. 53, no. 1, pp. 199–206, 1986.
- [9] R. Puccia, L. R. Travassos, "43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, no. 8, pp. 1610-5, 1991.
- [10] A. H. Straus, E. Freymüller, L. R. Travassos, H. K. Takahashi, "Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies", *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, vol. 34, no. 3, pp. 181-6, 1996.
- [11] A. P. Vicentini, J. L. Gesztes, M. F. Franco, et al., "Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis", *Infection and Immunology*, vol. 62, no. 4, pp. 1465–1469, 1994.
- [12] J. L. Gesztes, R. Puccia, L. R. Travassos, et al., "Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis", *Hybridoma*, vol. 15, no. 6, pp. 415-22, 1996.
- [13] C. P. Taborda, M. A. Juliano, R. Puccia, M. Franco, L. R. Travassos, "Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice", *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 2, pp. 786-93, 1998.
- [14] F. A. F. Popi, J. D. Lopes, M. Mariano. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cellular Immunology*, vol. 218, no. 1-2, pp. 87-94, 2002.
- [15] F. T. Konno, J. Maricato, A. Y. Konno, et al., "*Paracoccidioides brasiliensis* GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response", *Microbes and Infection*, vol. 14, no. 6, pp. 517-27, 2012.
- [16] H. C. de Oliveira, J. de F. da Silva, L. Scorzoni, et al., "Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp". *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, no. 303, Article ID 10.3389/fmicb.2015.00303, 2015.
- [17] J. de F. Silva, J. Vicentim, H. C. Oliveira, et al., "Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 110, no. 4, pp. 476-84, 2015.
- [18] I. Torres, O. Hernandez, D. Tamayo, et al., "Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*", *PLoS One*, vol. 8, no. 7, Article ID 10.1371/journal.pone.0068434, 2013.

- [19] C. L. Silva, L. M. Alves, F. Figueiredo, "Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*", *Microbiology*, vol. 140, no. Pt5, pp. 1189-94, 1994.
- [20] A. M. Della Coletta, T. F. Bachiega, J. C. de Quaglia e Silva, et al., "Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation In Vitro", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 9, no. 9, Article ID 10.1371/journal.pntd.0004037, 2015.
- [21] R. P. Gazendam, A. van de Geer, D. Roos, T. K. van den Berg, T. W. Kuijpers, "How neutrophils kill fungi", *Immunological Reviews*, vol. 273, no. 1, pp. 299-311, 2016.
- [22] L. Chen and L. A. DiPietro, "Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds", *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, vol. 6, no. 10, pp. 344-355, 2017.
- [23] E. M. Moresco, D. LaVine, B. Beutler, "Toll-like receptors", *Current Biology*, vol. 21, no. 13, pp. R488-93, 2011.
- [24] V. L. G. Calich, T. A. da Costa, M. Felonato, et al., "Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection", *Mycopathologia*, vol. 165, no 4-5, pp. 223-36, 2008.
- [25] F. V. Loures, A. Pina, M. Felonato, V. L. Calich, "TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection", *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 2, pp. 1279-90, 2009.
- [26] C. V. Bonfim, R. L. Mamoni, M. H. Blotta, "TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*", *Medical Mycology*, vol. 47, no. 7, pp. 722-33, 2009.
- [27] M. J. Acorci-Valério, A. P. Bordon-Graciani, L. A. Dias-Melicio, et al., "Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*", *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 71, no. 2, pp. 99-108, 2010.
- [28] F. S. Tristão, F. A. Rocha, A. P. Moreira, F. Q. Cunha, M. A. Rossi, J. S. Silva, "5-Lipoxygenase activity increases susceptibility to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection", *Infection and Immunology*, vol. 81, no. 4, pp. 1256-66, 2013.
- [29] H. A. Balderramas, O. G. Ribeiro, A. M. Soares, S. L. Oliveira, "The role of leukotriene B4 in early stages of experimental paracoccidioidomycosis induced in phenotypically selected mouse strains", *Medical Mycology*, vol. 51, no. 6, pp. 625-34, 2013.
- [30] H. A. Balderramas, M. Penitenti, D. R. Rodrigues, et al., "Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1", *Cytokine*, vol. 67, no. 1, pp. 36-43, 2014.
- [31] D. R. Rodrigues, R. K. Fernandes, H. A. Balderramas, et al., "Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*", *Cytokine*, vol. 69, no. 1, pp. 102-9, 2014.
- [32] M. A. Michelin, F. Figueiredo, F. Q. Cunha, "Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*", *Experimental Parasitology*, vol. 102, no. 3-4, pp. 170-7, 2002.
- [33] A. M. Soares, S. A. Calvi, M. T. Peraçoli, et al., "Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*", *Immunology*, vol. 102, no. 4, pp. 480-5, 2001.
- [34] A. P. Bordon, L. A. Dias-Melicio, M. J. Acorci, et al., "Prostaglandin E2 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes", *Microbes and Infection*, vol. 9, no. 6, pp. 744-7, 2007.

- [35] A. P. Bordon, L. A. Dias-Melicio, M. J. Acorci, et al., "Prostaglandin E(2) production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*", *Mycopathologia*, vol. 163, no. 3, pp. 129-35, 2007.
- [36] G. A. Biondo, L. A. Dias-Melicio, A. P. Bordon-Graciani, M. J. Acorci-Valério, A. M. Soares, "Paracoccidioides brasiliensis uses endogenous and exogenous arachidonic acid for PGEx production", *Mycopathologia*, vol. 170, no. 2, pp. 123-30, 2010.
- [37] R. K. Fernandes, T. F. Bachiega, D. R. Rodrigues, et al., "Paracoccidioides brasiliensis Interferes on Dendritic Cells Maturation by Inhibiting PGE2 Production", *PLoS One*, vol. 10, no. 6, Article ID 10.1371/journal.pone.0131380, 2015.
- [38] A. G. Romagnolo, J. C. de Quaglia E Silva, A. M. Della Coletta, et al., "Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*", *Mycoses*, vol. 61, no. 4, pp. 222-230, 2018.
- [39] L. F. de Castro, M. C. Ferreira, R. M. da Silva, et al., "Characterization of the immune response in human Paracoccidioidomycosis", *The Journal of Infection*, vol. 67, no. 5, pp. 470-85, 2013.
- [40] M. Franco, M. T. Peracoli, Soares A, et al., "Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis", *Current Topics in Medical Mycology*, vol. 5, pp. 115-49, 1993.
- [41] S. J. Oliveira, R. L. Mamoni, C. C. Musatti, P. M. Papaioordanou, M. H. Blotta, "Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls", *Microbes and Infection*, vol. 4, no. 2, pp. 139-44, 2002.

3. Conclusão

A partir dos nossos resultados, concluimos que a gp43 é reconhecida pelos receptores TLR2 e TLR4, estimulando a liberação de PGE2 e a produção de IL-17A por PMNs, respectivamente.

Nossos dados reforçam que o mecanismo de escape do fungo dos PMNs ocorre através da gp43, uma vez que IL-17A e PGE2 são mediadores inflamatórios envolvidos na susceptibilidade do hospedeiro à infecção fúngica na PCM.

4. Apêndices

APÊNDICE A – Aos voluntários da pesquisa foram feitas algumas questões antes de prosseguir com a coleta de sangue para evitar interações medicamentosas, infecções ou estados inflamatórios considerados possíveis modificadores do sistema imunológico.

Anamnese

1. Faz uso de algum tipo de medicação?
2. Realizou algum tratamento recente?
3. Há alteração endócrina (diabetes, gravidez, hipotireoidismo ou hipertireoidismo)?
4. Apresenta dor no corpo?
5. Sente cansaço mesmo sem ter feito exercício físico?

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – aprovado Pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o senhor(a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Avaliação da expressão de receptores celulares e da produção de citocinas e eicosanoides por neutrófilos humanos em resposta a glicoproteína gp43 do *Paracoccidioides brasiliensis*”, que será desenvolvido por mim Taiane Priscila Gardizani, bióloga e mestre em Patologia, com orientação da profissional biomédica e professora Dr.^a Luciane Alarcão Dias-Melicio da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

Estou estudando uma micose que afeta todo o organismo, geralmente de indivíduos em constante contato com solo, água e vegetação de áreas rurais, conhecida como *Paracoccidioidomicose*. Para que eu possa ter um resultado, nesse momento, preciso coletar 40ml do seu sangue para que seja realizado o isolamento de uma célula de defesa sanguínea, o neutrófilo. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma possível manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

A obtenção do neutrófilo presente em seu sangue é importante para esclarecer o papel dele quando na presença de uma molécula específica, a gp43, que faz parte do fungo, o causador da micose sistêmica. Dessa maneira, os resultados obtidos ao longo do estudo poderão beneficiar futuros pacientes.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para tratamentos realizados no âmbito da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em duas vias de igual teor, o qual uma via será entregue ao Senhor(a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de cinco anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das

8:00 às 11:30 e das 14:00 às 17:00, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior - Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão descritos ao final do documento.

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

Botucatu, ____/____/____

Pesquisadora

Participante da Pesquisa

Nome da Pesquisadora: Taiane Priscila Gardizani

Endereço: Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), Bloco 5, Avenida Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, Bairro: Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618970, Botucatu, SP.

Ponto de referência: ao lado do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências.

Telefone: (14) 3880-1750 ou (19) 99651-6712

E-mail: tai_gardizani@hotmail.com

Nome da orientadora: Luciane Alarcão Dias-Melicio

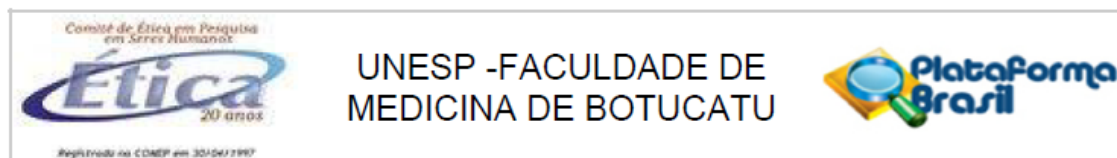
Endereço: Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Avenida Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, Bairro: Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618970, Botucatu, SP.

Telefone: (14) 3880-1592 ou (14) 99798-0413

E-mail: ladiasmelicio@fmb.unesp.br

5. Anexo

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES CELULARES E DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E EICOSANÓIDES POR NEUTRÓFILOS HUMANOS EM RESPOSTA A GLICOPROTEÍNA GP43 DO *Paracoccidioides brasiliensis*

Pesquisador: Taiane Priscila Gardizani

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80098817.8.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.421.694

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo experimental que avaliará a resposta imunológica de neutrófilos obtidos de amostra de sangue de 20 indivíduos saudáveis, quando encubados com a glicoproteína gp43 derivado do fungo *P. brasiliensis*.

A PBmicose é doença fúngica sistêmica endêmica na América Latina, e na nossa região. Embora o número de casos novos tenha diminuído há reativações frequentes, necessitando investigar a resposta imunológica para possível melhor controle da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de receptores celulares (TLR2, TLR4, TLR9, Dectina-1, Dectina-2 e MR) e a produção de citocinas (IFN-, IL-4, IL-17A, TNF-, IL-10, IL-4, IL-12 e IL-6) e eicosanóides (PGE2 e LTB4), após a interação de neutrófilos humanos com a gp43.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios somente indiretos, considerando que está se investigando uma possível resposta em pacientes portadores de PBM e a primeira análise *in vitro* com amostras de sangue de indivíduos saudáveis.

o risco está relacionado somente a coleta de sangue, considerado pequeno.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.421.694

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é bem delineada, em acórdância com a linha de pesquisa da orientadora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os termos de anuência institucional e da Unipex (uso da infra-estrutura).

O TCLE foi apresentado e está adequado.

foi confirmado que nenhum material biológico será guardado.

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sugiro aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 04 dezembro de 2017, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa, no entanto, informa que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1030814.pdf	20/11/2017 15:12:33		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartaCEPBiorepositorioTaiane.pdf	20/11/2017 14:59:38	Taiane Priscila Gardizani	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoDoutoradoTaianeGardizani.pdf	13/11/2017 11:36:06	Taiane Priscila Gardizani	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.421.694

Investigador	ProjetoDoutoradoTaianeGardizani.pdf	13/11/2017 11:36:06	Taiane Priscila Gardizani	Aceito
Outros	CartaDeAceiteUnipex.pdf	13/11/2017 11:31:39	Taiane Priscila Gardizani	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	13/11/2017 11:30:14	Taiane Priscila Gardizani	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	13/11/2017 11:29:05	Taiane Priscila Gardizani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/11/2017 11:24:52	Taiane Priscila Gardizani	Aceito
Folha de Rosto	PlatBrasil181TaianePriscilaGardizani_as sinada.Pdf	13/11/2017 11:19:17	Taiane Priscila Gardizani	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 07 de Dezembro de 2017

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br