

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 12/07/2021.



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.

Agradecimientos

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 (UNIPLEX) 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 paracoccidiodomicose (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 efetoras 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
<i>Referências</i>	25
2. Artigo Científico	32
<i>Abstract</i>	33
<i>Introduction</i>	34
<i>Materials and Methodos</i>	35
<i>Results</i>	37
<i>Discussion</i>	45
<i>Conclusion</i>	47
<i>References</i>	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 seqüela, 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 disфонia 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 (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), 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 (TGF- β), 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 conseqüente 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 efetoras 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 microbicida, 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 eicosanoides (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.