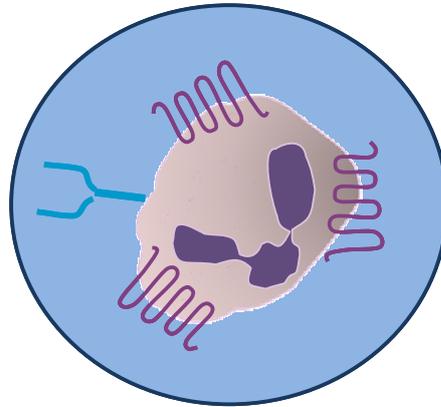
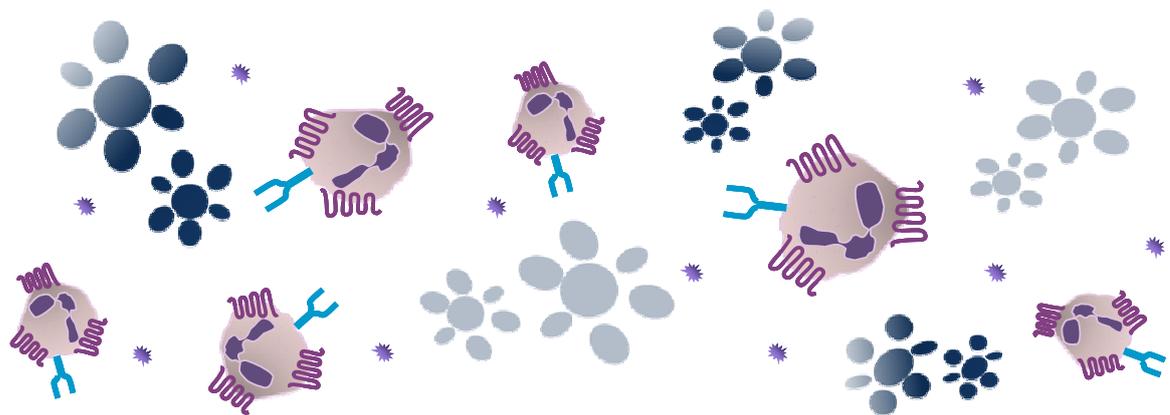


Michele Janegitz Acorci Valério



**Papel dos receptores Toll-like na  
atividade dos neutrófilos humanos  
desafiados com a cepa de alta  
virulência do *Paracoccidioides  
brasiliensis***



**Botucatu  
2009**

Michele Janegitz Acorci Valério

**PAPEL DOS RECEPTORES TOLL-LIKE NA  
ATIVIDADE DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS  
DESAFIADOS COM A CEPA DE ALTA  
VIRULÊNCIA DO *Paracoccidioides brasiliensis***

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Adj Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Luciane Alarcão Dias Melicio

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

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus**

Acorci-Valério, Michele Janegitz.

Papel dos receptores Toll-Like na atividade dos neutrófilos humanos  
desafiados com a cepa de alta virulência do *Paracoccidioides brasiliensis* /  
Michele Janegitz Acorci-Valério. – Botucatu : [s.n.], 2009.

**Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.**

Orientadora: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Co-orientadora: Luciane Alarcão Dias Melicio

Assunto CAPES: 21102007

1. Paracoccidioidomicose 2. Paracoccidioides brasilienses 3. Virulência

CDD 616.992

Palavras chave: Citocinas; Neutrófilos humanos; *Paracoccidioides  
brasiliensis*; Receptores Toll-like

Trabalho realizado nos  
Laboratórios do  
Departamento de  
Microbiologia e Imunologia  
do Instituto de Biociências,  
UNESP, Botucatu.

## *Dedico esse trabalho*

*Aos meus queridos pais Ademir e Neide*

*Exemplos de persistência e dedicação, pelo amor, apoio e pela compreensão em todos os momentos de minha vida. Tenho por vocês imensa gratidão por tudo que me deram com muito amor e carinho, que muitas vezes deixaram seus sonhos de lado, para ajudar a conquistar os meus.*

*Ao meu esposo Adriano*

*Por seu amor, compreensão e apoio constante. Você me fortalece para que eu consiga conquistar meus sonhos e me traz tranquilidade para enfrentar as dificuldades. Amo você...*

*Ao meu irmão Ademir Carlos*

*Meu amigo e confidente com quem posso contar sempre...por todo o carinho e amor que você dedica a mim.*

*À minha querida orientadora*

*Ângela Maria Victoriano de Campos Soares*

*Que Deus com sabedoria colocou em minha vida e com muita ética, paciência, exemplo e amor contribuiu de forma significativa no engrandecimento da minha formação científica e pessoal. Minha profunda admiração e amizade.*

*“Existem pessoas que quando deveriam ser simplesmente professores, foram mestres. Que quando deveriam ser mestres, foram amigos e em sua amizade nos compreenderam e nos incentivaram a seguir nosso caminho”.*

*Serei eternamente grata...*

## AGRADECIMENTOS

*Ao terminar esta tese de doutorado resta-me registrar os meus sinceros agradecimentos a todos que de várias formas contribuíram para que se tornasse uma realidade.*

*À Deus que se faz presente em todos os momentos da minha vida iluminando e me guiando sempre no caminho do bem.*

*A todos os meus familiares por todo carinho e apoio incondicional.*

*À minha amiga querida Márjorie de Assis Golim que soube me apoiar nos momentos de dificuldade, que sempre me incentivou, e dividiu comigo as alegrias da percepção dos obstáculos vencidos.*

*Às amigas fiéis Kattyá C. P. Jorge e Érika N. Takahagi pela amizade e por estarem ao meu lado em todos os momentos.*

*Aos meus queridos amigos Guilherme Biondo, Marina A. Mazoti, Sueli A. Calvi, Carla Côrrea, Camila Bannwart, Juliana S. Cavalheiro, Helanderson, Fátima R. Guimarães (Tatá) e Cibele Ferrari pela amizade constante, com certeza vocês fazem a diferença em minha vida, Muito obrigada pelo carinho e apoio.*

*À minha querida amiga Ana Paula Bordom Graciani pela amizade constante, participação ativa neste trabalho e pelos momentos de descontração, minimizando as dificuldades do cotidiano.*

*À minha querida co-orientadora e amiga Luciane A. D. Melício pela amizade e apoio na realização deste trabalho.*

*Aos colegas e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que acompanharam esta caminhada, obrigada pela convivência e apoio.*

*À Profª. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, pelo muito que contribuiu para a realização deste trabalho, pelo carinho e amizade.*

*Aos docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por sempre compartilharem suas experiências e conhecimentos e pela amizade, em especial a Dra. Alexandrina Sartori, Dr. José Maurício Sforcin, Dr. Ramon Kaneno, Dr. Sílvio Luis de Oliveira e Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli.*

*Aos professores Dra. Alexandrina Sartori e Dr. José Maurício Sforcin pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.*

*Aos funcionários do Depto. de Microbiologia e Imunologia, Sônia M. Faraldo, Leonice A. Garcia, Luis Severino (Lula) e Luis H. Alquati, por toda dedicação e serviços prestados.*

*Às minhas queridas amigas Márgorie A. Golim e Vália A. Silva (Léia), respectivamente pesquisadora e técnica do Laboratório de Citometria de Fluxo, do Hemocentro de Botucatu, pelo auxílio na realização da citometria.*

*À Profª. Dra. Márcia Guimarães e Jossimara Polentini pelo apoio científico e pela amizade.*

*Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina por toda dedicação, auxílio e amizade.*

*Às bibliotecárias pela disposição e realização da ficha catalográfica, em especial minha querida amiga Meirinha por todo carinho.*

*Ao Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, à Solange, secretária da Pós-Graduação do Depto. De Doenças Tropicais, pelo apoio e auxílio constante.*

*À Capes pela concessão da bolsa de doutorado.*

# SUMÁRIO

## 1. Resumo

13

## 2. Abstract

16

## 3. Introdução

19

## 4. Objetivos

32

## 5. Casuística e Métodos

34

### 5.1 Casuística

34

### 5.2 Isolamento de neutrófilos humanos

34

### 5.3 Obtenção das suspensões de *P. brasiliensis*

35

### 5.4 Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo

35

### 5.5 Bloqueio de TLR2 e TLR4

36

#### 5.5.1 Avaliação da atividade fungicida

36

#### 5.5.2 Avaliação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

37

#### 5.5.3 Dosagem de citocinas

38

### 5.6 Análise estatística

38

## 6. Resultados

40

6.1 Expressão de TLR2 e TLR4

40

6.2 Participação de TLR2 e TLR4 na atividade fungicida

42

6.3 Participação de TLR2 e TLR4 na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

44

6.4 Participação de TLR2 e TLR4 na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10

46

7. Discussão

51

8. Conclusões

60

9. Referências bibliográficas

62

## 1. RESUMO

Na paracoccidiodomicose, os estudos sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro destacam o papel das células fagocitárias que participam ativamente dos mecanismos efetores diretos contra o fungo e da modulação da resposta inflamatória. Dentre essas células, nos últimos anos, os estudos têm se voltado para os neutrófilos, que exercem um importante papel efetor e modulador principalmente durante os estágios iniciais da infecção. As funções dessas células, incluindo as antimicrobicidas, podem ser reguladas por citocinas pró e anti-inflamatórias. Apesar dos mecanismos celulares e moleculares desse processo não estarem completamente entendidos, trabalhos nos últimos anos têm mostrado de forma bastante consistente o envolvimento dos “*Toll Like Receptors*” (TLRs). Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram: 1- Avaliar a expressão de TLR2 e TLR4 por neutrófilos humanos pré-ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  e desafiados com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18 (Pb18). 2- Avaliar a participação desses receptores na atividade fungicida, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e das citocinas: IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e IL-10 por neutrófilos humanos pré-ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e desafiados com Pb18. Nos ensaios referentes ao primeiro objetivo, as células foram tratadas por 18 horas com cada uma das citocinas ou LPS, posteriormente desafiadas com Pb 18 por 4 horas e avaliadas quanto a expressão de TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo. Nos referentes ao segundo objetivo, as células foram ativadas com os mesmos estímulos, submetidas ao bloqueio de TLR2 e TLR4, através da incubação das células com anticorpos monoclonais específicos, desafiadas com Pb18 por 4 horas e analisadas quanto a atividade fungicida, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e IL-10, por Elisa. Os resultados mostraram que todas as citocinas testadas aumentaram a expressão de TLR2 e TLR4. Da mesma forma, o Pb18 aumentou a expressão de TLR2, exercendo um efeito aditivo ao das citocinas. Ao contrário, o fungo diminuiu a expressão de TLR4. Todas as citocinas aumentaram a atividade fungicida de neutrófilos contra o Pb18. No entanto, esse aumento não esteve associado à modulação de TLR2 e TLR4, induzida por essas citocinas e ou Pb18. Da mesma forma, todas as

citocinas e o Pb18 aumentaram a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, de forma semelhante ao detectado para a atividade fungicida, esse processo não envolveu a modulação de TLR2 e TLR4. A ativação dos neutrófilos com GM-CSF e TNF- $\alpha$  resultou em um aumento significativo na produção de IL-8. Ao contrário, essa citocina não foi detectada após ativação com IL-15 e IFN- $\gamma$ . O Pb18 estimulou as células a produzirem IL-8 exercendo um efeito aditivo ao das citocinas GM-CSF e TNF- $\alpha$ . Nenhuma das citocinas testadas aumentou a produção de IL-10. Um aumento significativo foi detectado apenas após o desafio com o fungo. O efeito das citocinas e /ou Pb18 sobre a produção de IL-8 e IL-10 envolveu a participação de TLR2 e principalmente TLR4. Os resultados sugerem que a interação do Pb18 com neutrófilos humanos via TLR2 e TLR4 pode ser considerada como um mecanismo de patogenicidade, uma vez que esse fungo usa o TLR2 e principalmente o TLR4 para a sua entrada nas células e escapar das suas funções efectoras, através da produção de IL-8 e IL-10.

## 2. ABSTRACT

In paracoccidioidomycosis, phagocytic cells appear to provide one of the major lines of host defense. In this context, in last years, various studies have focused on the role of neutrophils that are involved in primary response to the fungus. Neutrophil functions are regulated by pro and anti-inflammatory cytokines. The molecular and cellular mechanisms involved in this process are not fully understood, but there are strong evidences about the involvement of “*Toll Like Receptors*” (TLRs). In this context, we aimed to evaluate TLR2 and TLR4 expression on human neutrophils primed with the cytokines GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  and challenged with a virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). Moreover, we asked if these receptors have a role on fungicidal activity, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and IL-10 production, by primed and challenged cells. In first assays, neutrophils were incubated with each of cytokines or LPS by 18 h, challenged with Pb18 by 4 h and evaluated by TLR2 and TLR4 expression by flow cytometry. In other assays, cells were incubated with each of cytokines or LPS by 18h, submitted to TLR2 and TLR4 blocking by specific monoclonal antibodies, challenged with Pb18 for 4 h and evaluated for fungicidal activity, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and IL-10 production, by ELISA. All cytokines increased TLR2 and TLR4 expression. Pb18 increased TLR2 expression inducing an additional effect to that of cytokines. On the contrary, it inhibited TLR4 expression. All cytokines increased neutrophils fungicidal activity, but this process was not associated with TLR2 or TLR4 expression. All cytokines and Pb18 increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, but in the same manner to fungicidal activity, the process was not associated to TLR2 or TLR4 expression. Neutrophils activation with GM-CSF and TNF- $\alpha$  resulted in a significative increase on IL-8 production, while IL-15 and IFN- $\gamma$  have no effect. Pb18 also increased IL-8 production inducing an additional effect to that of cytokines. None of the cytokines activated neutrophils to release IL-10. This cytokine was only detected after Pb18 challenge. Interestingly, cytokines production involved TLR2 and mainly TLR4 expression. The results suggested that Pb18 interaction with neutrophils through TLR2 and TLR4 may be considered as a pathogenic

mechanism, since this fungus uses TLR2 and mainly TLR4 to escape from host effector mechanisms, by producing IL-8 and IL-10.

### 3. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo imperfeito e dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* e quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos, e na forma de micélio à temperatura ambiente com variação de 4 a 28°C<sup>1</sup>.

Afeta principalmente trabalhadores rurais, que estão constantemente em contato com a vegetação e o solo. Na forma aguda da doença, jovens de ambos os sexos são afetados proporcionalmente. Porém, na forma crônica do adulto há predominância de homens em relação às mulheres afetadas, sendo esse processo relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos. Estudos *in vitro* demonstram que estrógenos inibem a transformação de micélios ou conídios em leveduras, processo que proporciona a instalação da infecção<sup>2-3</sup>. Paralelamente, foi demonstrada a presença de receptores para estrógeno tanto na fase micelial como na leveduriforme do fungo<sup>4-5</sup>.

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos presentes em água, plantas e solo, que penetrariam no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando o chamado complexo primário pulmonar. Esse processo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção, identificada pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina<sup>6</sup>. Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais pela via linfo-hematogênica<sup>7</sup>. As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma aguda é habitualmente grave, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodo e medula óssea). A forma crônica tem duração

prolongada, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema<sup>8-9</sup>.

O estabelecimento da doença, disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como sua virulência, composição antigênica, das condições ambientais; e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, e principalmente capacidade de desenvolver uma resposta imune eficaz. Em relação a este último fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos específicos e inespecíficos de defesa na determinação da resistência ao *P. brasiliensis*<sup>8, 10-13</sup>.

A imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos. Dentre os vários mecanismos envolvidos nesta resposta, os envolvendo as células fagocitárias desempenham papel central na resistência contra esses patógenos, com destaque para a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida. Estas funções, no entanto, dependem de mecanismos de ativação dessas células, gerados pela interação com o próprio fungo ou com fatores da resposta imune inespecífica e específica, como as citocinas<sup>13-16</sup>.

Neste contexto, macrófagos murinos não apresentam atividade fungicida ou fungistática contra o *P. brasiliensis*, permitindo a multiplicação do mesmo no seu interior. Este achado pode ter implicações importantes na patogênese da doença, sugerindo que, *in vivo*, o fungo se multiplique intracelularmente após a ingestão por macrófagos não ativados, levando à destruição das células e conseqüente liberação de inúmeras formas de *P. brasiliensis*<sup>17</sup>.

Da mesma forma, monócitos e macrófagos humanos normais, não ativados, permitem o crescimento e a multiplicação intracelular do *P. brasiliensis*<sup>18</sup>. Em estudos realizados com pacientes, detectou-se que macrófagos alveolares de indivíduos com teste intradérmico positivo a paracoccidioidina, mostraram capacidade de degradar o fungo, enquanto que essa atividade não foi detectada nos pacientes com paracoccidioidina negativa. Esses resultados indicam que nos pacientes com resposta imune celular adequada, os macrófagos estariam sendo ativados, passando a apresentar atividade contra o fungo<sup>19</sup>.

Esses resultados deixam clara a importância da ativação para que as células fagocitárias adquiram atividades antifúngicas. Nesse sentido, macrófagos murinos ativados por IFN- $\gamma$ , passam a ter capacidade de digerir o fungo<sup>17, 20-21</sup>. Macrófagos cultivados em presença de citocinas liberadas por células de baço de animais imunizados aumentaram a sua capacidade de destruir conídios, assim como inibiram a transformação de conídios em levedura<sup>22</sup>.

No que se refere às células humanas, estudos mostram que monócitos e macrófagos de indivíduos normais quando ativados por IFN- $\gamma$  inibem o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*<sup>18</sup>. Trabalhos em nosso laboratório mostraram que a pré-incubação de monócitos com IFN- $\gamma$  não induz essas células a uma eficiente atividade fungicida contra cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Essa atividade é adquirida somente após pré-incubação com TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  mais IFN- $\gamma$ , ou GM-CSF<sup>23-24</sup>. Quando as células são desafiadas com cepa de baixa virulência, a pré-ativação apenas com IFN- $\gamma$  é suficiente para aquisição de uma eficiente atividade fungicida, demonstrando que na dependência da cepa utilizada, o processo de ativação das células fagocitárias pode necessitar de sinais dados por diferentes citocinas.

Em relação aos mecanismos através dos quais os monócitos e macrófagos ativados exercem sua atividade fungicida, estudos em nosso laboratório demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- $\alpha$  envolve a geração de metabólitos do oxigênio como a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>25</sup>. Para os macrófagos murinos, os trabalhos têm demonstrado que a atividade antifúngica de macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  independe dos metabólitos do O<sub>2</sub>, ocorrendo a participação dos metabólitos do nitrogênio como o NO<sup>26</sup>. No entanto, estudos em nosso laboratório demonstraram a participação tanto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como do NO na atividade fungicida de macrófagos murinos ativados com TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ <sup>27</sup>.

Os trabalhos citados acima deixam clara a necessidade de um processo de ativação das células mononucleares para a aquisição de atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*. Esse processo pode ocorrer nas primeiras fases de interação do fungo, durante o desenvolvimento de uma resposta inata. Nesta fase, as fontes das principais citocinas envolvidas, o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ ,

seriam as células NK para o IFN- $\gamma$ <sup>28-29</sup> ou os próprios macrófagos alveolares, no caso do TNF- $\alpha$ . Segundo Figueiredo et al<sup>30</sup>, tanto cepas de *P. brasiliensis* quanto frações da parede celular, ricas em  $\beta$ -glucanas são capazes de induzir níveis elevados de TNF- $\alpha$ , sendo possível sua detecção em soro de camundongos inoculados por via intraperitoneal com o fungo. As frações e a  $\beta$ -glucana purificada estimularam a secreção *in vitro* de TNF- $\alpha$  por macrófagos murinos, sugerindo que essa citocina é produzida em resposta ao *P. brasiliensis* e regulada por vários constituintes da parede celular do fungo.

Calvi et al<sup>24</sup>, estudando pacientes com paracoccidioidomicose, verificaram que a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos infectados, *in vitro*, com a cepa de menor virulência (Pb265), induzia níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  em comparação à cepa virulenta (Pb18). Além disso, níveis mais elevados dessa citocina apresentaram correlação com a maior atividade fungicida dos monócitos, demonstrando a importância do TNF- $\alpha$  nesse mecanismo. Da mesma forma, a incubação de monócitos humanos com IFN- $\gamma$  mais fração de parede do *P. brasiliensis* rica em  $\beta$ -glucana, induziu essas células a uma maior produção de TNF- $\alpha$  com conseqüente aquisição de maior atividade fungicida<sup>31</sup>. Assim, os níveis dessa citocina poderiam variar na dependência da virulência ou da composição da parede celular da cepa com a qual o indivíduo entra em contato, e conseqüentemente interferir na evolução da doença.

Após as primeiras fases, durante a evolução da infecção, as citocinas ativadoras das células fagocitárias podem ser geradas por elementos da resposta imune adaptativa, como os linfócitos CD<sub>4</sub> Th1. Vários trabalhos mostram que uma resposta protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta Th1 envolvendo como principais citocinas o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12<sup>32-34</sup>.

Os trabalhos acima citados mostram o interesse da literatura em estabelecer os fatores de ativação e desativação, representados pelas citocinas, sobre as células fagocitárias mononucleares murinas e humanas, desafiadas com o *P. brasiliensis*. No entanto, outras células que merecem ser estudadas em relação a esses processos, são os neutrófilos, uma vez que a literatura tem chamado a atenção para o envolvimento dinâmico dessas células na defesa do hospedeiro contra os diversos microrganismos.

Assim, sugere-se que logo após a infecção, o *P. brasiliensis* interaja com os macrófagos alveolares induzindo a liberação de quimiocinas, que atraem neutrófilos. Nesse sentido, peptídeos de baixo peso molecular, detectados no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos incubados com o *P. brasiliensis* são capazes de atrair neutrófilos para a cavidade peritoneal<sup>35</sup>. Outros estudos mostraram uma associação entre as quimiocinas KC e MIP-1  $\alpha$  (CCL3) e a infiltração de neutrófilos durante a fase aguda da infecção<sup>36</sup>. Provavelmente, como resultado desses processos, detecta-se uma infiltração maciça destas células nas lesões da doença humana<sup>8, 37-38</sup> e de animais de experimentação<sup>10, 39-40</sup>. Estudos em linhagens de animais suscetíveis e resistentes à infecção, depletados de neutrófilos durante as primeiras fases da infecção, mostraram que essas células desempenham um importante papel nos mecanismos de defesa contra o fungo, mas que seus efeitos dependem do padrão genético do hospedeiro uma vez que a depleção agravou de forma muito mais intensa a infecção nos camundongos suscetíveis quando comparados aos resistentes<sup>41</sup>.

Vários trabalhos têm demonstrado a capacidade estimuladora de várias citocinas sobre o “burst” respiratório ou atividade citotóxica de neutrófilos e dentre elas podem ser citadas o IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-15<sup>42-48</sup>. A necessidade de um processo de ativação de neutrófilos para destruição de *P. brasiliensis* tem sido detectada em alguns trabalhos. McEwen et al<sup>49</sup>, demonstraram que neutrófilos de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* e estimulados com o fungo morto por via intraperitoneal, apresentaram maior atividade fungicida *in vitro*.

Neutrófilos de camundongos resistentes à infecção por via intraperitoneal e subcutânea “air pouch” encontram-se ativados e apresentam maior atividade fungicida contra o fungo, quando comparados com células de animais suscetíveis. Um intenso infiltrado neutrofílico “air pouch” esteve associado com resposta de hipersensibilidade tardia em ambas as linhagens<sup>50</sup>. Outros estudos mostraram que neutrófilos humanos não ativados apresentam atividade fungistática<sup>51</sup> e fungicida contra o *P. brasiliensis*<sup>52</sup>. No entanto, esses efeitos antifúngicos são significativamente aumentados após a ativação com

IFN- $\gamma$ , IL-1 e GM-CSF. As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-8 não apresentaram efeito sobre essas atividades<sup>51, 53</sup>.

Em nosso laboratório, mostramos que neutrófilos não ativados não desenvolvem atividade antifúngica. No entanto, uma significativa atividade fungicida é obtida após ativação com as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF<sup>54</sup> e IL-15<sup>55</sup>. Adicionalmente, os resultados sugeriram a participação do ânion superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como moléculas efetoras dos neutrófilos ativados contra o fungo.

Em conclusão, os resultados dos trabalhos citados acima reforçam a idéia de que os neutrófilos possuem um envolvimento dinâmico na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, uma vez que as atividades dessas células podem ser reguladas por elementos da resposta imune inata e específica.

O reconhecimento inicial de microorganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata. A interação entre moléculas de superfície do parasita e receptores homólogos presentes na membrana celular das células fagocíticas, incluindo os neutrófilos, modulam a fagocitose e a ativação dessas células<sup>56</sup>. Entre esses receptores destacam-se os receptores semelhantes a toll (TLRs, *Toll-like receptors*), através dos quais as células são capazes de reconhecer microorganismos, com consequente estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas<sup>56-57</sup>.

Os TLRs são uma família de proteínas transmembrânicas, evolutivamente conservadas entre insetos e humanos<sup>58-60</sup>, que foram primeiramente identificados como moléculas essenciais para padrão embriogênico em *Drosophila* e, posteriormente como chave na imunidade antifúngica<sup>61</sup>. Essas proteínas servem como receptores de reconhecimento padrão para uma variedade de moléculas derivadas de microrganismos e estimulam a resposta imune inata. Assim, a expressão e ativação de TLRs contribui para a defesa do hospedeiro contra infecções em *Drosophila*, camundongos e humanos<sup>61-63</sup>. A ativação de TLRs pode regular não apenas a fagocitose e atividade microbicida, mas também a liberação de citocinas e diferenciação de células dendríticas imaturas, capacitando o sistema imune a induzir a resposta imune adaptativa<sup>60, 64-66</sup>.

Todos esses receptores contêm repetições ricas em leucina, flanqueadas por sequências ricas em cisteínas em suas regiões extracelulares

e um domínio de homologia ao receptor Toll/IL-1R (TIR) em suas regiões citoplasmáticas, o que é essencial para a sinalização<sup>67</sup>. A interação dos TLRs com seus ligantes específicos leva ao recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras contendo domínios TIR tais como a MyD88 e outras. A maioria dos TLRs com exceção do TLR3 medeia sinais intracelulares dependente de MyD88. Esse processo resulta no recrutamento de proteínas das famílias IRAK e fator 6 associado ao receptor para TNF (TRAF6) levando à ativação de MAP “kinases” e fatores de transcrição incluindo NF-κB e AP-1 que são críticos para a indução de várias citocinas pró e anti inflamatórias<sup>68-70</sup>.

A expressão de TLRs na superfície celular pode ser detectada por anticorpos monoclonais principalmente em monócitos e células dendríticas imaturas<sup>71</sup>. Entretanto, a expressão de TLR é observada em outras células, incluindo neutrófilos, células endoteliais vasculares, adipócitos, miócitos cardíacos e células epiteliais intestinais. A expressão de vários TLRs é também modulada em resposta a diferentes estímulos<sup>72</sup>. Alguns TLRs podem reconhecer uma variedade de ligantes. Em muitos casos, dois diferentes TLRs colaboram entre si ou com outro co-receptor para envio de sinais, após interação com o ligante microbiano<sup>73</sup>. Por exemplo, TLR4 e seu co-receptor MD-2, reconhecem LPS de bactérias gram-negativas bem como polissacáride de *Cryptococcus neoformans*<sup>74</sup>. Por outro lado, TLR2 medeia resposta celular a peptidoglicanos de bactérias, lipoproteínas e zimosan, em cooperação com TLR1 ou TLR6<sup>73</sup>. Assim, a resposta imune inata a uma espécie de microrganismo pode refletir a integração das respostas de vários TLRs para diferentes moléculas produzidas pelo microrganismo<sup>71-74</sup>.

Dentre os vários microrganismos estudados em relação à suas interações com TLRs destacam-se alguns fungos de importância médica. Trabalhos visando o estudo dessas interações têm permitido um melhor entendimento do papel desses receptores nos mecanismos de proteção ou patogênese nessas infecções<sup>60, 75-76</sup>.

Os primeiros trabalhos com esse objetivo foram realizados com *Candida albicans* e os resultados têm se mostrado discrepantes. Netea et al<sup>77</sup>, mostraram que o TLR4 desempenha um importante papel na proteção de camundongos contra a candidíase disseminada. Esse processo envolve a participação desse receptor na produção de quimiocinas como KC e MIP-2

importantes para o influxo de neutrófilos. Por outro lado, não houve uma associação entre esses receptores e produção de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , assim como com os mecanismos envolvidos na morte fúngica, como produção de óxido nítrico e ânion superóxido. Outros autores mostraram o não envolvimento do TLR4 na resistência a infecção por *C.albicans*, uma vez que camundongos defeituosos na expressão desse receptor apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes aos camundongos controles não defeituosos<sup>78</sup> e foram capazes de montar uma resposta do tipo Th1 contra esse microrganismo<sup>79</sup>.

Os resultados também se apresentam discrepantes em relação ao papel do TLR2. Villamón et al<sup>80</sup> observaram que camundongos deficientes de TLR2, experimentalmente infectados por *C. albicans*, apresentaram menor sobrevivência quando comparada com animais controle, concluindo que a expressão desse receptor é crucial para a proteção dos camundongos contra candidíase disseminada. A produção *in vitro* de TNF- $\alpha$  e MIP-2 por macrófagos de camundongos TLR2<sup>-/-</sup>, em resposta a *C. albicans*, foi significativamente inibida nesses animais o que poderia contribuir para a diminuição do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. No entanto, a fagocitose das leveduras e produção de reativos intermediários do oxigênio (ROIS) não foi afetada nos camundongos TLR2<sup>-/-</sup>. Em um outro estudo, esses mesmos autores observaram que no início da infecção por *C. albicans*, a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ , foi significativamente inibida nos camundongos deficientes de TLR2<sup>81</sup>.

Outros estudos mostraram que animais TLR2<sup>-/-</sup> são mais resistentes a candidíase disseminada do que animais normais sendo esse processo associado a um aumento da quimiotaxia e capacidade fungicida dos macrófagos. Os autores não encontraram diferenças quanto à produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, porém, a produção de IL-10 foi fortemente inibida nos animais TLR2<sup>-/-</sup>, fato que esteve associado com a diminuição de células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg). Os autores concluíram que a *C. albicans* escapa das defesas do hospedeiro através de sinais mediados pelo TLR2<sup>75</sup>. Enquanto os resultados em relação à participação de TLR2 e TLR4 nos mecanismos de resistência ou suscetibilidade à infecção com *C. albicans* são

ainda conflitantes, o envolvimento das moléculas MyD88 nos mecanismos de proteção contra esse fungo encontram um grande suporte na literatura<sup>80, 82-83</sup>.

Resultados conflitantes também tem sido observados em relação à participação dos TRLs na infecção por *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Estudos têm mostrado que a glicoroxilomanana (GXM), o principal componente da cápsula do *C. neoformans* tem capacidade de ligar-se às células via CD14 e TLR4. No entanto, esse processo resulta em uma ativação incompleta dessas células, com conseqüente produção inadequada de TNF- $\alpha$ <sup>74</sup>. Outros estudos mostraram que MyD88 e TLR2, mas não TLR4 estão envolvidos na proteção contra o *C. neoformans*<sup>84</sup>. Yauch et al<sup>85</sup> demonstraram que embora GXM seja um ligante importante para TLR2, TLR4 e CD14, esse receptores tem uma participação mínima na resposta à infecção pelo *C. neoformans*, em relação ao importante papel desempenhado pela molécula MyD88. Corroborando com esses dados, estudos mais recentes<sup>86</sup> realizados com objetivo de elucidar o papel do TLR2 e TLR4 na criptococose, mostraram que ambos contribuem de forma bastante discreta para os mecanismos de proteção do hospedeiro contra esse fungo.

Estudos têm mostrado que CD14 e TLR4 desempenham um importante papel no reconhecimento de hifas do fungo *A. fumigatus* assim como no processo de sinalização para a produção de TNF- $\alpha$ , produzida por monócitos em resposta a esse fungo<sup>87</sup>. Outros trabalhos mostraram que antígenos de *A. fumigatus* induzem a ativação de células dendríticas imaturas humanas e neutrófilos, via TLR2 e TLR4<sup>88</sup>. De forma semelhante, outros autores mostraram que tanto conídios, como hifas do fungo induzem a translocação do NF- $\kappa$ B liberando citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e MIP-2 via ligação tanto a TLR2 como TLR4<sup>89</sup>. Por outro lado, outros estudos mostraram que o fungo estimula as defesas inatas do hospedeiro por mecanismos independentes de TLR2 e TLR4<sup>90</sup>. Netea et al<sup>91</sup>, demonstraram que tanto conídios e hifas de *A. fumigatus* são capazes de estimular a produção de citocinas via TLR2, enquanto que somente o conídio estimula as células via TLR4, resultando em uma importante produção de IL-10, um processo que sugere um mecanismo de escape do fungo.

O papel dos TLRs nos mecanismos de resistência e ou susceptibilidade a infecção pelo *P. brasiliensis* também tem sido investigado. Calich et al<sup>76</sup>, usando camundongos TLR4 deficientes e nocautes para TLR2 mostraram que tanto o TLR2 como o TLR4 estão envolvidos no reconhecimento do fungo. Esse reconhecimento resulta em um aumento da capacidade fagocítica com infecção de macrófagos e secreção de NO. No entanto, esse processo parece não levar a uma eficiente atividade macrofágica e diminuição significativa da carga fúngica, pois tanto animais normais quanto os deficientes apresentaram a mesma taxa de sobrevivência à infecção. Animais nocautes para a molécula MyD88 apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente menor quando comparada a dos animais normais não nocauteados.

Em conjunto, os resultados mostram uma importância das moléculas MyD88 no processo de ativação das células fagocitárias que culmina com maior destruição fúngica e conseqüentemente maior resistência à infecção e que ao contrário o TLR4 e TLR2 parecem estar envolvidos nos mecanismos de virulência do fungo. Nesse sentido Ferreira et al<sup>92</sup> relatam que em animais suscetíveis, a diferenciação de células dendríticas regulatórias que secretam altas concentrações de IL-10 e baixas de IL-12 ocorrem via ativação de TLR2 e Dectin-1. Em relação às moléculas MyD88, resultados diferentes foram detectados por Gonzalez et al<sup>93</sup>, uma vez que camundongos nocauteados para a expressão dessa molécula apresentaram a mesma carga fúngica, assim como igual capacidade de liberarem citocinas pró-inflamatórias, levando a conclusão de que essa molécula não é essencial para os envios dos sinais celulares que culminam com maior destruição fúngica e conseqüente proteção contra a infecção.

A análise dos trabalhos acima mostra que apesar dos importantes conhecimentos adquiridos, o papel dos TLRs no desenvolvimento da imunidade inata e adquirida na paracoccidiodomicose necessita ser melhor investigado, particularmente em relação às células humanas, como os neutrófilos.

Os neutrófilos são consideradas como as células protótipos da resposta imune inata. Assim, vários estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar o papel dos TLRs na função dessas células<sup>56</sup>. Trabalhos

iniciais mostraram que neutrófilos humanos expressam TLR2, TLR4 e TLR5, mas não TLR3, e que essa expressão pode ser aumentada por LPS, lipoarabinomana ou citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  e diminuída por citocinas anti-inflamatórias como a IL-10<sup>94</sup>. Ao contrário, outros estudos mostraram que LPS, GM-CSF e TNF- $\alpha$  inibem, enquanto a IL-10 aumenta de uma forma discreta a expressão de TLR2<sup>95</sup>. Kurt-Jones et al<sup>96</sup> mostraram que neutrófilos expressam TLR2, mas pequenas concentrações de TLR4. Adicionalmente, o tratamento de neutrófilos com GM-CSF aumentou a expressão de RNAm para CD14 e TLR2 e a produção de IL-8 e ânion superóxido em resposta a ligantes de TLR2. Estudos mais completos objetivando avaliar a expressão de vários TLRs por neutrófilos humanos, demonstraram que essas células expressam os TLRs de 1 a 10, com exceção do 3. Adicionalmente, os agonistas de todos os TLRs estimularam ou primaram as células para a produção de citocinas como IL-8 e outras quimiocinas, geração de ânion superóxido, aumento da fagocitose, inibição da quimiotaxia mediada por IL-8 e “shedding” de L selectina. Os resultados mostraram ainda que embora o GM-CSF aumente a expressão e as funções mediadas por todos os TLRs estudados, a ação dessa citocina mostrou-se mais acentuada em relação a TLR2 e TLR9. Em estudo recente, O’ Mahony et al<sup>97</sup> demonstraram que a expressão constitutiva de TLR2, TLR4 e TLR9 em neutrófilos é semelhante àquela detectada em monócitos, enquanto que a expressão de TLR5 é menor. Os autores ainda demonstraram que além do GM-CSF, o IFN- $\gamma$  é um importante indutor da expressão de TLR2 e TLR4 nessas células.

Em conjunto, a análise dos trabalhos da literatura mostra claramente que as funções dos neutrófilos, incluindo as antimicrobicas podem ser reguladas por citocinas pró e anti-inflamatórias. Apesar dos mecanismos celulares e moleculares desse processo não estarem completamente entendidos, trabalhos nos últimos anos tem mostrado de forma bastante consistente o envolvimento dos TLRs.

Diante desse contexto, acreditamos ser de extrema importância no estudo da interação dos neutrófilos com o *P. brasiliensis*, a avaliação do papel dos TLRs no processo de ativação dessas células com as diferentes citocinas que culmina com aumento de suas funções antifúngicas.

#### 4. OBJETIVOS

1- Avaliar a expressão de TLR 2 e 4 por neutrófilos humanos pré-ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e desafiados com cepa virulenta de *P. brasiliensis*.

2- Avaliar a participação desses receptores na atividade fungicida e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos humanos pré-ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e desafiados com cepa virulenta de *P. brasiliensis*.

3- Avaliar a participação desses receptores na produção das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  por neutrófilos humanos pré-ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e desafiados com cepa virulenta de *P. brasiliensis*.

## **5. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **5.1- Casuística**

Foram avaliados neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos normais, doadores de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento (OF. 398/2007 – CEP).

### **5.2- Isolamento de neutrófilos humanos**

Sangue periférico de indivíduos normais foi obtido por punção venosa, sendo 10mL colocados em tubos de ensaio estéreis contendo 10U/mL de heparina (Liquemine-Roche). As células polimorfonucleares foram obtidas por meio da separação em gradiente de Percoll e Ficoll-Hypaque. O anel rico em células polimorfonucleares foi lavado com meio RPMI por 10 minutos a 200g. Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA), 40µg/mL de gentamicina e 10% de soro autólogo inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC). A contagem, identificação e viabilidade dos neutrófilos foram realizadas através da coloração com azul tripan (alíquotas de 50uL da suspensão celular foram diluídas em 50uL de corante). Foram utilizadas suspensões com viabilidade maior ou igual a 95%. Em seguida, foi ajustada a concentração para  $2 \times 10^6$  neutrófilos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular em placas de microculturas de 96 (100µL/orifício) ou 24 (1.0mL/orifício) orifícios. As células foram incubadas, em tensão de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 18 horas com diferentes estímulos na dependência do experimento a ser realizado.

### **5.3- Obtenção das suspensões de *P. brasiliensis***

Foi utilizada a cepa de alta virulência de *P. brasiliensis* (Pb18) mantida em nosso laboratório através do cultivo em (GPY), contendo 2% de glicose, 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura à 37°C, em tubos de 20x20 mm, com subcultivos semanais. As culturas foram usadas após 5 ou 6 dias de cultivo. As células foram removidas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10mL de meio RPMI, com posterior homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37°C durante 3 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, os sobrenadantes dessas suspensões foram coletados, sendo alíquotas dos mesmos utilizadas para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que apresentaram aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. Foram utilizadas suspensões com viabilidade maior ou igual a 90%<sup>98</sup>.

### **5.4- Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo**

Culturas de neutrófilos humanos obtidas conforme item 5.2 em placas de 96 orifícios (100µL/orifício) foram incubadas por 18 horas somente com meio de cultura, ou as citocinas GM-CSF (100U/mL), IL-15 (31,2ng/mL), TNF- $\alpha$  (250U/mL) ou IFN- $\gamma$  (50U/mL) ou LPS (20µg/mL), considerado como um controle positivo da ativação de neutrófilos para expressão desses receptores. Após 18 horas, as culturas foram incubadas por 4 horas somente com meio de cultura ou desafiadas com suspensão de Pb18 na concentração de  $4 \times 10^4$  fungos/mL de meio de cultura contendo 10% de soro autólogo (relação fungo neutrófilo de 1:50) Após esse período, as células foram transferidas para tubos Falcon para citômetro (BD - Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 1250 rpm por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1mL de solução eletrolítica (ISOTON II). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-TLR4 conjugado com PE (ficoeritrina) e com anti-TLR2 conjugado com FITC (isotiocianato de

fluoresceína) durante 15 minutos. Para cada teste foi feito um tubo controle no qual as células foram incubadas com anticorpos de controle isotópico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm para lavagem e ressuspensas em 1mL de ISOTON II e fixadas com 50µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD - Becton, Dickinson and Company) e analisadas por citometria de fluxo.

### **5.5- Bloqueio de TLR2 e TLR4**

Culturas de neutrófilos humanos foram incubadas com meio de cultura ou GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  por 18 horas. Após esse período, foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 ou anti-TLR4 por 1 hora (0.5µg/10<sup>6</sup> células) e posteriormente desafiadas com 4x10<sup>4</sup> fungos/mL de meio de cultura contendo 10% de soro autólogo (relação fungo neutrófilo de 1:50) por 4 horas a 37°C, em atmosfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> e testadas em relação à atividade fungicida. Protocolo semelhante foi utilizado para os ensaios de avaliação da participação de TLR2 e TLR4 sobre a produção de citocinas e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com exceção de que nos ensaios de citocinas, além da pré-ativação com, GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  as células foram pré-incubadas com LPS 20ug/ml. Nos ensaios de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as culturas foram desafiadas com suspensão de Pb18 (4X10<sup>4</sup> fungos/mL; relação fungo/neutrófilo de 1:50) diluída em tampão de vermelho fenol.

#### **5.5.1- Avaliação da atividade fungicida**

Após o período de desafio com o fungo por 4h, as culturas foram submetidas a diversas lavagens com água destilada. Este processo permitiu que os neutrófilos fossem removidos e lisados, com conseqüente liberação dos fungos que foram fagocitados. As suspensões obtidas foram consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com culturas contendo apenas as suspensões do fungo, que foram consideradas como culturas controle.

Ao final do processo, o material obtido, a partir das lavagens com água destilada resultaram em um volume de 2mL. Essas suspensões, contendo fungos viáveis ou não foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 20

segundos, seguida de plaqueamento em triplicatas em placas (100µL/placa) contendo meio de cultura BHI-ágar (OXOID LTD. England), na concentração de 47g/L, acrescido de 4% de soro de cavalo, 50µg/mL de gentamicina e 5% de extrato aquoso. O extrato aquoso foi preparado segundo o método de Kurita et al.<sup>99</sup>, a partir de filtrado de culturas leveduriformes do fungo (cepa 192), cultivadas em meio GPY a 37°C e com agitação (120 rpm) durante 7 dias. A atividade fungicida foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 10 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

$$AF = [1 - (\text{média das UFC das culturas experimentais} / \text{média das UFC das culturas controles})] \times 100$$

### **5.5.2- Avaliação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari em 1980<sup>100</sup>, e adaptado por Pick e Mizel em 1981<sup>101</sup>. Assim como descrito no item 5.5, as culturas foram desafiadas com suspensão de Pb18 (4X10<sup>4</sup> fungos/mL; relação fungo/neutrófilo de 1:50) diluída em vermelho fenol contendo 140Mm de NaCl; 10Mm de tampão de fosfato pH 7; 5,5Mm de dextrose; 0,56Mm de vermelho fenol; 0,01mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma), e 10% de soro autólogo fresco. Após 4 horas a reação foi interrompida pela adição de 0,01mL de NaOH 1N. As amostras foram ensaiadas em triplicatas e a absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620nm, contra um branco constituído por solução vermelho fenol de NaOH a 1N. Os resultados das dosagens de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram expressos em nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2x10<sup>5</sup> células, a partir de curva-padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão vermelho fenol. A curva foi realizada com concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 e 8.0nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **5.5.3- Dosagem de citocinas**

Após o desafio com o fungo (item 5.5) a quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos foi realizada por ELISA, utilizando-se Kit Duo Set (R&D Systems), seguindo instruções do fabricante.

### **5.6- Análise estatística**

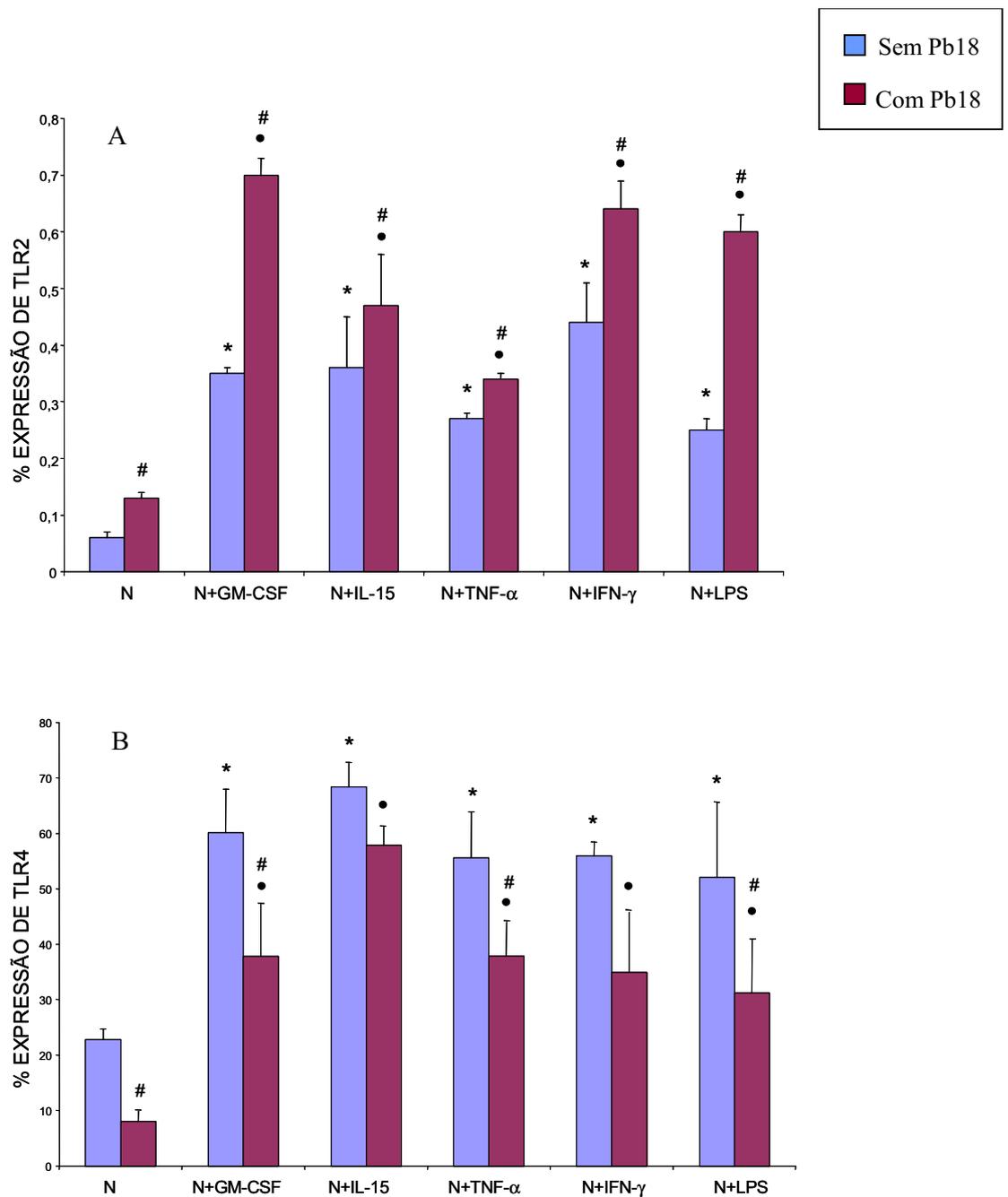
A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad InStat San Diego, California – USA<sup>102</sup>. Diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância para amostras dependentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer, assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro for menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1- Expressão de TLR2 e TLR4

Nas Figuras 1 A e 1B, são mostrados os resultados referentes à expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de neutrófilos não ativados ou ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ou LPS e desafiados ou não com Pb18. Neutrófilos não ativados e não desafiados expressaram baixos níveis de TLR2 que aumentaram após ativação com as citocinas ou LPS, embora diferenças estatisticamente significativas tenham sido detectadas somente após ativação com GM-CSF, IL-15 e IFN- $\gamma$ . Após o desafio com o fungo, todas as culturas apresentaram um aumento nos níveis de TLR2 quando comparados aos apresentados pelas culturas não desafiadas. Em relação ao TLR4, as células não desafiadas mostraram um perfil de resposta semelhante ao detectado para a expressão de TLR2, isto é, células ativadas com os diferentes estímulos expressaram níveis significativamente maiores do receptor quando comparados aos detectados para as células não ativadas. No entanto, após o desafio com o fungo, níveis menores do receptor foram expressos em todas as culturas em comparação às não desafiadas.

Em conjunto, os resultados mostram que tanto as citocinas como o LPS modularam positivamente a expressão de TLR2 e TLR4 pelos neutrófilos. No entanto, a modulação pelo fungo mostrou-se diferente em relação aos dois receptores. Após o desafio, um efeito aditivo ao estímulo das citocinas foi detectado para o TLR2, enquanto que ao contrário, um efeito inibitório ocorreu em relação ao TLR4. A análise de expressão desses dois receptores mostra ainda que em todas as culturas os níveis de expressão de TLR2 foram sempre menores do que os de TLR4.



**Fig. 1** Expressão de TLR2 (A) e TLR4 (B) por neutrófilos humanos não ativados (N) ou ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ou LPS e desafiados ou não com Pb18. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

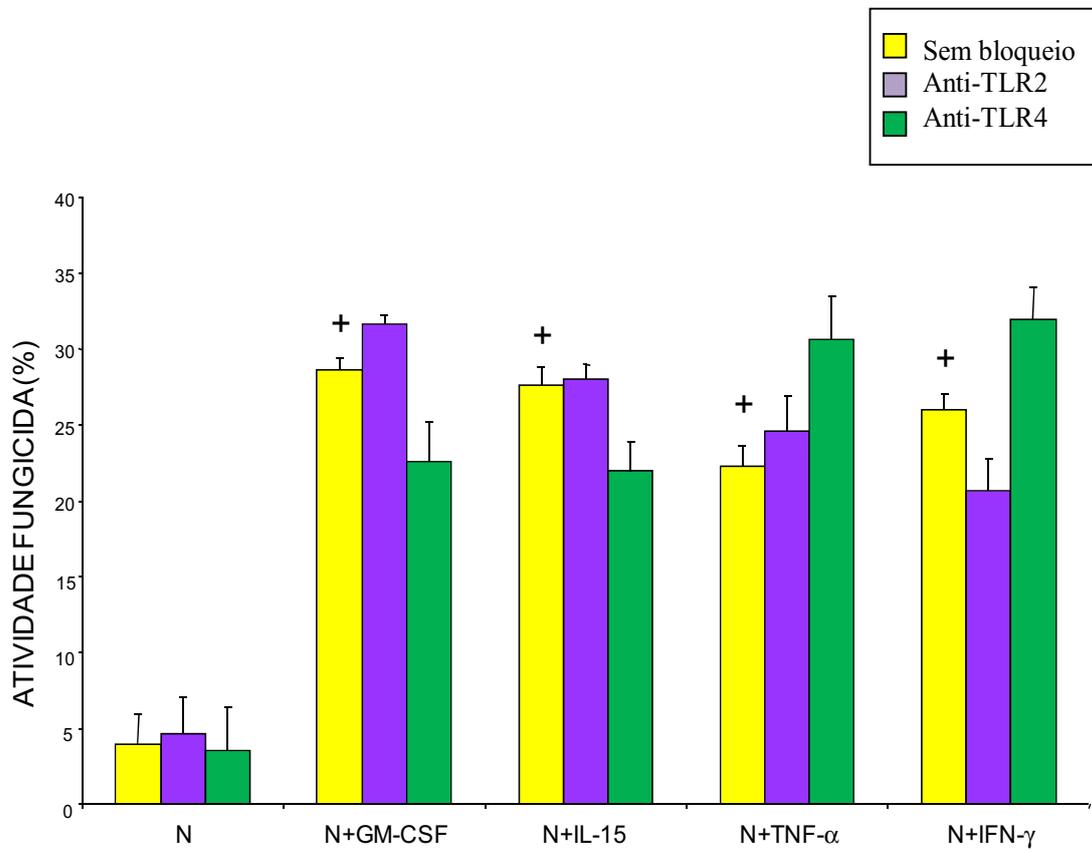
\* p<0,05 X PMN

• p<0,05 X PMN+Pb

# p<0,05 X sem Pb

## **6.2- Participação de TLR2 e TLR4 na atividade fungicida**

Uma vez demonstrado que tanto as citocinas como o fungo modulam a expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos, realizamos experimentos com o objetivo de avaliar o papel desses dois receptores na atividade fungicida destas células. Esses experimentos foram realizados comparando este parâmetro antes e após o bloqueio de TLR2 ou TLR4 com anticorpos monoclonais específicos. Experimentos paralelos confirmaram a inibição da expressão dos receptores após os bloqueios (dados não mostrados). Os resultados referentes à atividade fungicida são mostrados na Figura 2. Podemos observar que as células não ativadas apresentam uma baixa atividade fungicida contra o Pb18. No entanto, essa atividade foi significativamente maior após a ativação das células com GM-CSF, IL-15, TNF $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ . No entanto, esse perfil de resposta não foi alterado quando as células foram bloqueadas com anti TLR2 ou anti TLR4, mostrando a não participação desses receptores na atividade fungicida de neutrófilos ativados contra o Pb18.

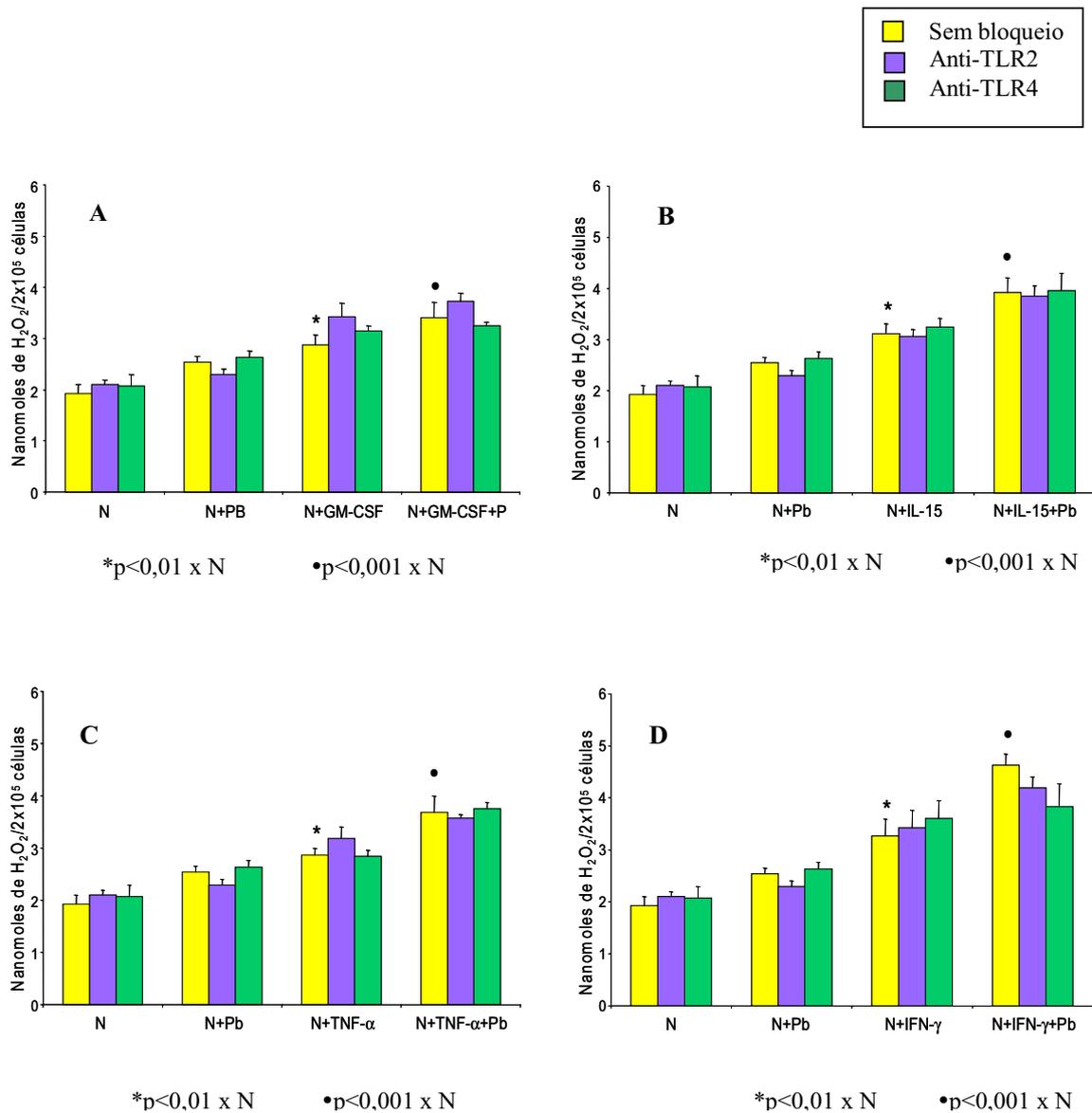


**FIG. 2** Atividade fungicida de neutrófilos humanos não ativados (N) ou ativados com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , tratados ou não com anti-TLR2 ou anti-TLR4 e desafiados com Pb18. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão.

+p<0,05 x PMN+Pb sem bloqueio

### **6.3- Participação de TLR2 e TLR4 na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Nas Figuras 3A a 3D são mostrados os resultados referentes à ativação com GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , respectivamente. A análise conjunta desses resultados mostra um padrão de resposta bastante semelhante entre as citocinas testadas. Neutrófilos não ativados e não desafiados liberaram níveis substanciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que aumentaram após o desafio com o fungo (dados não significativos estatisticamente). Níveis significativamente aumentados foram detectados após a ativação com as diferentes citocinas e principalmente após a ativação e desafio com o fungo. Assim, os maiores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram liberados após a pré-incubação das células com cada uma das citocinas e posterior desafio com o fungo, mostrando um efeito aditivo dos 2 estímulos. De forma semelhante ao detectado para atividade fungicida esse padrão de resposta não foi alterado após o bloqueio de TLR2 ou TLR4, o que descarta o envolvimento desses receptores na produção desse metabólito.



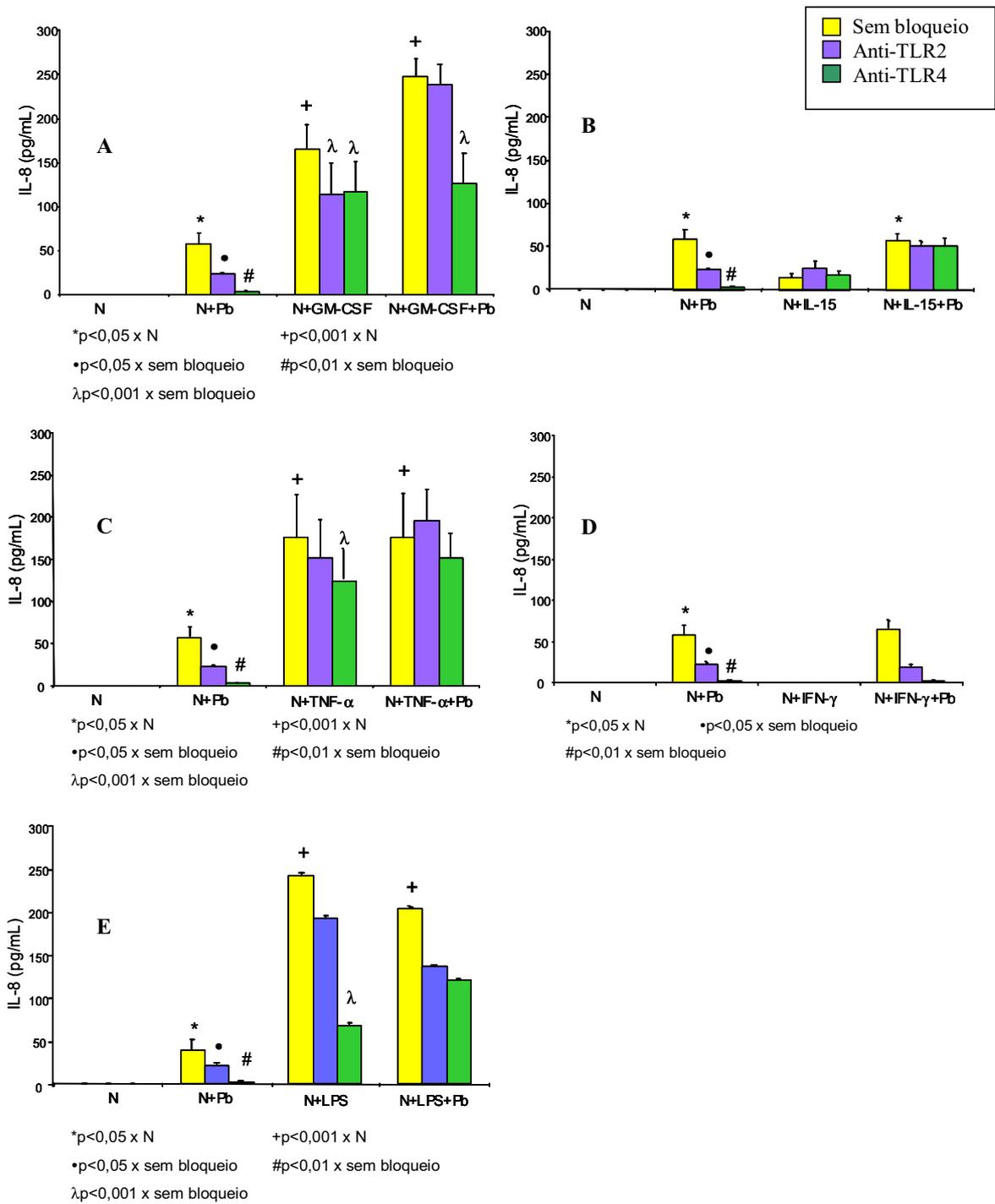
**Fig.3** Produção de  $H_2O_2$  por neutrófilos humanos não ativados (N) ou ativados com GM-CSF (A), IL-15 (B), TNF- $\alpha$  (C) e IFN- $\gamma$  (D), tratados ou não com anti-TLR2 ou anti-TLR4 e desafiados com Pb18. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

#### **6.4- Participação de TLR2 e TLR4 na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10**

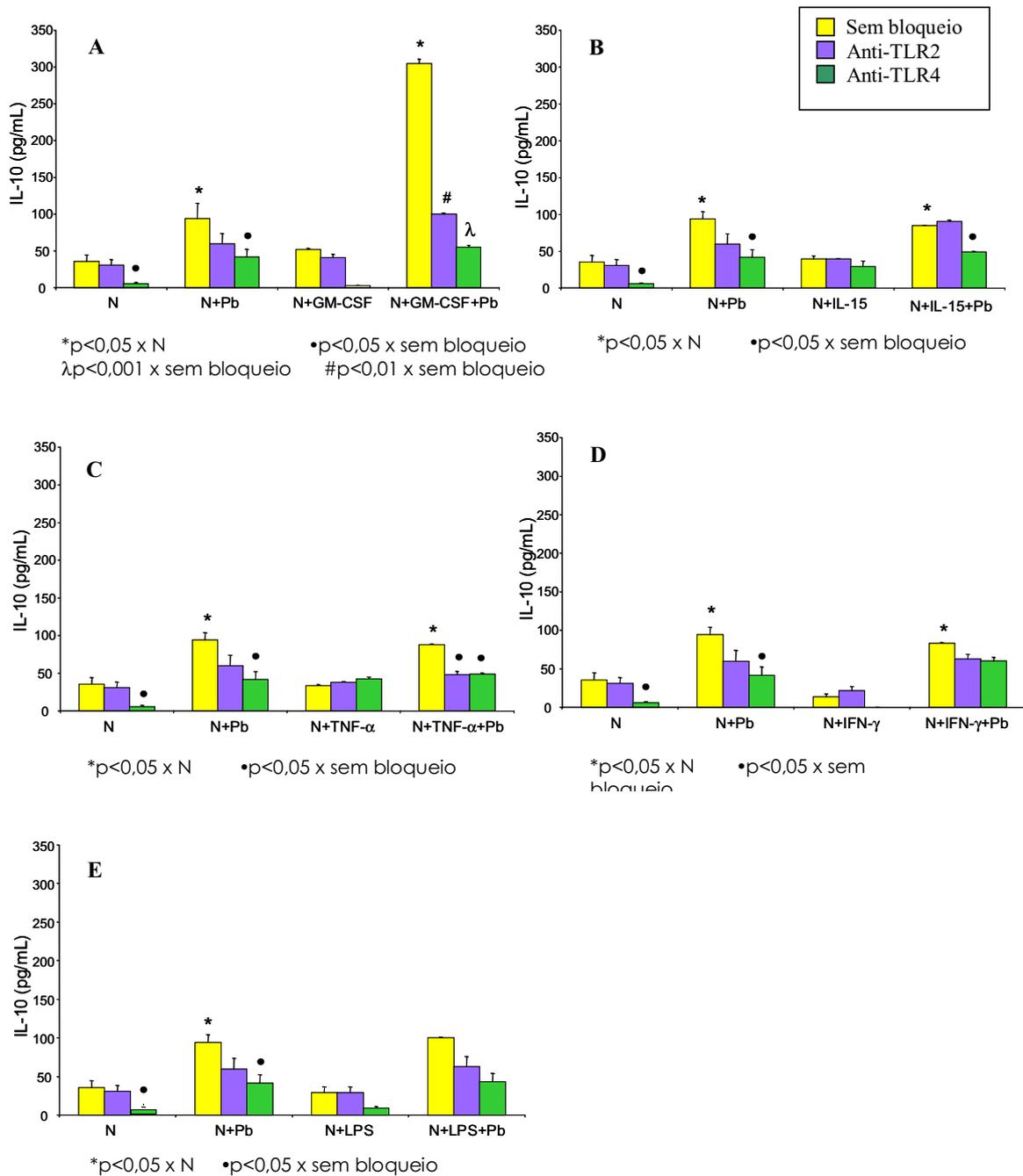
Não foram detectados níveis significativos de TNF- $\alpha$  ou IL-6 em nenhuma das culturas testadas. Assim, serão mostrados os resultados referentes à detecção de IL-8 (Figuras 4A a 4E) e IL-10 (Figuras 5A a 5E). Na Figura 4A podemos analisar os resultados referentes aos ensaios com GM-CSF. Células não ativadas e não desafiadas não liberaram IL-8, que foi detectada somente após o desafio com o fungo. Níveis significativamente maiores em relação ao desafio com o fungo foram detectados após a ativação com GM-CSF e principalmente após ativação e desafio com o fungo. Um perfil de resposta diferente foi detectado nos ensaios com IL-15 (Figura 4B), uma vez que as culturas ativadas com essa citocina não liberaram níveis significativamente aumentados de IL-8. Esses níveis foram observados somente nas culturas desafiadas com o fungo ou ativadas e desafiadas. Nas culturas testadas com TNF- $\alpha$  (Figura 4C) voltamos a detectar um perfil de resposta semelhante ao GM-CSF com a qual observamos um efeito tanto da citocina como do fungo sobre a produção de IL-8. No entanto, de forma diferente ao detectado para o GM-CSF, não observamos um efeito aditivo do fungo à resposta do TNF- $\alpha$ , uma vez que os níveis liberados após ativação com TNF- $\alpha$  e posterior desafio, foram semelhantes aos detectados somente pela ativação. As culturas testadas com LPS mostram um perfil semelhante ao do GM-CSF, isto é, tanto o fungo como o LPS estimulam as células a produzirem IL-8, havendo um efeito aditivo desses dois estímulos. Os ensaios com IFN- $\gamma$  mostram uma total incapacidade dessa citocina estimular as células a produzirem IL-8, uma vez que níveis significativos estiveram associados somente ao estímulo com o fungo. Juntos, os resultados sugerem que o Pb18, as citocinas GM-CSF, TNF- $\alpha$  e o LPS modulam positivamente a produção de IL-8 por neutrófilos, enquanto a IL-15 e o IFN- $\gamma$  não apresentam tal efeito. Na análise de todos os resultados referentes à dosagem de IL-8 chama a atenção que os níveis dessa citocina tendem a diminuir nas culturas tratadas com anti-TLR2 e principalmente anti-TLR4, com a qual em várias culturas, as diferenças são estatisticamente significativas, mostrando uma possível participação

desses receptores na capacidade dos neutrófilos produzirem IL-8 em resposta aos estímulos testados.

Nas Figuras 5A a 5E podem ser analisados os resultados referentes à dosagem de IL-10. Na Figura 5A observamos que as células não ativadas e não desafiadas liberam baixos níveis da citocina que, no entanto, aumentaram discretamente após a ativação com GM-CSF. Ao contrário, um aumento significativo foi detectado após o desafio com o fungo ou ativação com GM-CSF e desafio. Um perfil de resposta bastante semelhante foi detectado nos ensaios com LPS e as outras citocinas (Figuras 5B a 5E: experimentos com IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e LPS, respectivamente). Juntos, os resultados sugerem que ativação com as diferentes citocinas não resulta em aumento significativo da produção de IL-10 por neutrófilos, uma vez que os níveis significativamente aumentados estiveram associados somente ao desafio com o fungo. Chama a atenção, que os níveis de IL-10 tendem a diminuir nas culturas tratadas com anti-TLR2 e principalmente com anti-TLR4, mostrando uma possível participação desses receptores na produção dessa citocina.



**Fig.4** Produção de IL-8 por neutrófilos humanos não ativados (N) ou ativados com GM-CSF (A), IL-15 (B), TNF-α (C), IFN-γ (D) e LPS (E), tratados ou não com anti-TLR2 ou anti-TLR4 e desafiados com Pb18. Os resultados são expressos em média±erro padrão.



**Fig.5** Produção de IL-10 por neutrófilos humanos não ativados (N) ou ativados com GM-CSF (A), IL-15 (B), TNF-α (C), IFN-γ (D) e LPS (E), tratados ou não com anti-TLR2 ou anti-TLR4 e desafiados com Pb18. Os resultados são expressos em média±erro padrão.

## 7. DISCUSSÃO

Na paracoccidioidomicose, alguns trabalhos têm reforçado a idéia de que os neutrófilos exercem um importante papel efetor principalmente durante os estágios iniciais da infecção, uma vez que essas células desempenham atividade fungicida ou fungistática eficiente após ativação por várias citocinas<sup>51</sup>,

53-54

Tradicionalmente, trabalhos da literatura mostram claramente que as funções dos neutrófilos, incluindo as antimicrobicidas podem ser reguladas por citocinas pró e anti-inflamatórias. Apesar dos mecanismos celulares e moleculares desse processo não estarem completamente entendidos, trabalhos nos últimos anos tem mostrado de forma bastante consistente o envolvimento dos TLRs. No entanto, na paracoccidioidomicose não existem trabalhos como o objetivo de avaliar o papel desses receptores nas funções antifúngicas das células fagocitárias, particularmente as relacionadas aos neutrófilos humanos.

Neste contexto, objetivamos no presente trabalho avaliar o papel do Pb18 e ou das principais citocinas ativadoras de neutrófilos na modulação da expressão de TLR2 e TLR4 por essas células. Adicionalmente tivemos interesse em avaliar se esse processo interfere nas funções antifúngicas dessas células. Os resultados mostraram que as citocinas GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  modularam positivamente a expressão de TLR2 e TLR4 pelos neutrófilos. No entanto, a modulação pelo fungo mostrou-se diferente em relação aos dois receptores. Após o desafio, um efeito aditivo ao estímulo das citocinas foi detectado para o TLR2, enquanto que ao contrário, um processo de inibição ocorreu em relação ao TLR4. Em relação ao TLR2, os resultados podem ser interpretados como uma capacidade tanto das citocinas como do fungo de estimular a expressão desse receptor. Em relação ao TLR4, estamos hipotetizando que esse receptor poderia ser utilizado pelo fungo para a sua entrada na célula, o que explicaria a diminuição da sua expressão após o desafio.

Apesar dos trabalhos na literatura serem bastante discrepantes em relação à modulação da expressão dos TLRs em neutrófilos, em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho encontram suporte na literatura,

particularmente em relação à capacidade dos neutrófilos expressarem os dois receptores e à modulação dos mesmos por citocinas. Trabalhos iniciais mostraram que os neutrófilos humanos expressam TLR2, TLR4 e TLR5, mas não TLR3 e que essa expressão pode ser aumentada por LPS, lipoarabinomanana ou citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  e diminuída por citocinas anti-inflamatórias como a IL-10<sup>94</sup>. Outros estudos demonstraram que essas células expressam os TLRs de 1 a 10, com exceção do 3. Os resultados mostraram ainda que embora o GM-CSF aumente a expressão e as funções mediadas por todos os TLRs estudados, a ação dessa citocina mostrou-se mais acentuada em relação a TLR2 e TLR9. O' Mahony et al<sup>97</sup> demonstraram que a expressão constitutiva de TLR2, TLR4 e TLR9 em neutrófilos é semelhante àquela detectada em monócitos, enquanto que a expressão de TLR5 é menor. Os autores ainda demonstraram que além do GM-CSF, o IFN- $\gamma$  é um importante indutor da expressão de TLR2 e TLR4 nessas células. Em relação ao mecanismo de ligação do fungo ao TLR4 para entrada na célula, estudos recentes corroboram nossos achados. Calich et al<sup>76</sup>, usando camundongos TLR4 deficientes e nocautes para TLR2 mostraram que tanto o TLR2 como o TLR4 estão envolvidos no reconhecimento do fungo.

Uma vez estabelecida a capacidade das citocinas e ou o Pb18 de modularem a expressão de TLR2 e TLR4, realizamos experimentos para avaliar uma possível associação entre essa modulação e algumas atividades neutrofilicas como atividade fungicida, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e liberação de citocinas. Alguns resultados detectados nesses ensaios reforçam achados anteriores no nosso laboratório, que mostraram a capacidade das citocinas GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em ativarem neutrófilos humanos para uma maior liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumento na atividade fungicida<sup>54-55, 103</sup>. No entanto, no presente trabalho fica claro que a modulação de TLR2 e TLR4 por essas citocinas e ou o Pb18 não estiveram associadas às funções dos neutrófilos como atividade fungicida e produção de metabólitos do oxigênio, uma vez que o bloqueio tanto de TLR2 como de TLR4 não resultou em alterações importantes nessas funções.

Esses achados encontram algum suporte na literatura no sentido de que estudos têm mostrado que a glicoroxilomanana (GXM), o principal

componente da cápsula do *C. neoformans*, tem capacidade de se ligar às células via CD14 e TLR4. No entanto, esse processo resulta em uma ativação incompleta dessas células, com conseqüente produção inadequada de TNF- $\alpha$ <sup>74</sup>. Yauch et al<sup>84</sup>, demonstraram que embora a GXM seja um ligante importante para TLR2, TLR4 e CD14, esses receptores têm uma participação mínima na resposta à infecção pelo *C. neoformans*, quando comparada à desempenhada pela molécula MyD88. Da mesma forma, Netea et al<sup>77</sup>, mostraram que apesar do TLR4 desempenhar um importante papel na proteção de camundongos contra a candidíase disseminada, não foi detectada uma associação entre esses receptores e os mecanismos envolvidos na morte fúngica, como produção de óxido nítrico e ânion superóxido. Nossos resultados também concordam com o papel desses receptores na infecção *in vivo* com o *P. brasiliensis*, uma vez que, apesar do reconhecimento do fungo via TLR2 e TLR4 resultar em um aumento da capacidade fagocítica com infecção de macrófagos e secreção de NO, esse processo parece não levar a uma eficiente atividade macrofágica e diminuição significativa da carga fúngica, pois tanto animais normais quanto os deficientes apresentaram a mesma taxa de sobrevivência à infecção<sup>76</sup>.

O não envolvimento do TLR2 e TLR4 nas atividades antifúngicas efetoras diretas de neutrófilos humanos, leva-nos a questionar sobre a participação de outros receptores nesse processo. Alguns trabalhos têm mostrado a importância dos receptores de manose na ingestão do *P. brasiliensis* pelas células fagocíticas<sup>104-106</sup>, assim como do receptor para o componente C3 do sistema complemento (CR3)<sup>107-108</sup>. No entanto, no caso de neutrófilos humanos podemos descartar a participação dos receptores para manose, uma vez que além dos TLRs, tem sido mostrada a presença de alguns receptores na superfície dos neutrófilos como CR3, dectin-1, mas não do receptor de manose<sup>109</sup>. Assim, podemos discutir a possível participação do CR3 e do dectin-1. Em relação a este último, estudos têm demonstrado o seu envolvimento na atividade fungicida de neutrófilos humanos contra *C. albicans*<sup>110</sup>. Estudos em nosso laboratório estão sendo conduzidos para avaliar a participação tanto de CR3 como dectin-1 na resposta de neutrófilos ao *P. brasiliensis*.

No presente trabalho, ao contrário do detectado para os mecanismos de destruição do fungo, observamos algumas associações importantes entre a modulação da expressão de TLR2 e TLR4 e a produção de citocinas como IL-10 e IL-8. De início, objetivamos avaliar os níveis das citocinas IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. No entanto, em nenhuma das culturas avaliadas detectamos níveis de TNF- $\alpha$  ou IL-6. A incapacidade dos neutrófilos produzirem IL-6 pode ser esperada uma vez que Bazzoni et al<sup>111</sup> mostraram que não há evidência da expressão do gene para IL-6 em PMNs, após fagocitose de leveduras opsonizadas por IgG ou ativação com LPS. Adicionalmente, outros trabalhos mostram a não detecção de mRNA e liberação de IL-6 mesmo por neutrófilos obtidos de tecido inflamado<sup>112</sup>.

No entanto, vários outros trabalhos mostram evidência da produção de IL-6 por essas células, em resposta ao LPS<sup>113-115</sup>. Adicionalmente, Cicco et al<sup>116</sup> demonstraram que além da expressão de mRNA e liberação de IL-6 por PMN ativadas com LPS, essas células produzem essa citocina em resposta a GM-CSF, TNF- $\alpha$  e PMA e alguns microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*<sup>117</sup> e *C. neoformans*<sup>118</sup>. Um ponto importante de discussão é a possibilidade da liberação dessa citocina ter ocorrido por monócitos, devido a contaminação da cultura de neutrófilos por essas células. Uma vez que a nossa metodologia permite o isolamento de uma população bastante purificada de neutrófilos (98%), acreditamos realmente na incapacidade dessas células produzirem IL-6.

Nossos resultados mostrando que neutrófilos não liberaram TNF- $\alpha$  em resposta às citocinas ativadoras, LPS ou ao fungo não concordam com os da literatura uma vez que Lindemann et al<sup>119</sup>, demonstraram pela primeira vez que neutrófilos humanos expressam mRNA para TNF- $\alpha$ , após estimulação com GM-CSF. No entanto, esses autores não detectaram atividade dessa citocina no sobrenadante de células estimuladas. Resultados posteriores também demonstraram baixos níveis dessa citocina nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos incubados simultaneamente com LPS e IFN- $\gamma$ . Outros estudos demonstraram que essas células são capazes tanto de sintetizar como secretar essa citocina somente quando ativadas com LPS<sup>113, 120</sup>. Neutrófilos purificados respondem ao LPS complexado a proteína ligante de LPS sérica liberando

TNF- $\alpha$  por um mecanismo dependente dessa molécula<sup>121</sup>. Adicionalmente, foi demonstrado que PMNs expressam mRNA e secretam TNF- $\alpha$  em resposta a partículas de leveduras opsonizadas por IgG, sendo essa produção significativamente maior que a induzida pelo LPS<sup>111</sup>.

Os neutrófilos ainda liberam TNF- $\alpha$  em resposta a *Staphylococcus aureus*<sup>122</sup>, assim como expressam mRNA e secretam essa citocina em resposta a *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* e *E. coli*<sup>117, 123</sup>. Níveis significativos de TNF- $\alpha$  também são detectados após a incubação de neutrófilos com eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*<sup>123</sup>, *C. neoformans* e sua porção polissacarídica<sup>124</sup> e *C. albicans* e sua fração manoproteica<sup>125</sup>.

Uma possível explicação para os nossos resultados seria o período de coleta dos sobrenadantes de culturas, que foi de no mínimo 18 horas. Esse período poderia ter sido tardio para a detecção dessa citocina que é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias a serem liberadas após exposição das células a um determinado estímulo.

Resultados diferentes foram obtidos na avaliação de IL-8 e IL-10. Neste caso tanto o fungo como o LPS e as citocinas GM-CSF e TNF- $\alpha$  estimularam os neutrófilos a liberarem IL-8. Adicionalmente, os resultados sugeriram uma participação de TLR2 e principalmente TLR4 nesse processo. Estes resultados concordam com a literatura no sentido de que a IL-8 é a citocina produzida em maior concentração pelos neutrófilos. Trabalhos têm detectado a produção e liberação dessa citocina por essas células em resposta ao LPS<sup>126-127</sup> e também por leveduras opsonizadas por IgG<sup>127</sup>. Outros trabalhos mostram que a produção de IL-8 por neutrófilos também pode ser induzida por várias citocinas como TNF- $\alpha$ <sup>126, 128-130</sup>, GM-CSF<sup>130-132</sup> e IL-1<sup>44, 133-136</sup>. Os neutrófilos ainda secretam essa citocina após fagocitose com *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*<sup>137</sup>, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*<sup>138</sup>, *M. tuberculosis*, ou com o seu componente de parede a lipoarabinomanana<sup>139</sup>. Os neutrófilos também produzem IL-8 quando em contato com alguns vírus como o Epstein-barr (EBV)<sup>140</sup>. No que se refere aos fungos, neutrófilos secretam IL-8 em resposta a *C. neoformans*, ou a GXM o principal polissacarídeo capsular

desse fungo. Adicionalmente, a pré-incubação dos neutrófilos com zimosan, *C. albicans* ou fração manoproteica desse microorganismo (MP-F2) aumentou significativamente os níveis de IL-8 nos sobrenadantes de culturas dessas células<sup>44, 125, 141</sup>.

Em relação a IL-10, nossos resultados mostraram que neutrófilos não ativados e não desafiados produzem níveis basais dessa citocina, que não aumentam após a ativação com as diferentes citocinas e o LPS. No entanto, após o desafio com o fungo o nível dessa citocina aumenta significativamente e esse aumento esteve associado à expressão dos receptores TLR2 e principalmente TLR4. A produção de IL-10 por neutrófilos em resposta ao Pb18, difere da literatura mostrando que neutrófilos humanos não expressam RNA e não secretam IL-10 em resposta a vários estímulos como LPS ou LPS associado a TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, PMA, zimosan opsonizadas ou não, leucotrienos e outros<sup>139, 142-144</sup>.

O envolvimento de TLR2 e TLR4 na produção de IL-8 e IL-10 pelos neutrófilos concorda com outros estudos que mostram o papel desses receptores na produção de citocinas pelas células fagocitárias em resposta a vários estímulos, incluindo fungos. Nesse sentido, têm sido demonstrado que o TLR4 participa dos mecanismos de proteção de camundongos contra *C. albicans*, via seu envolvimento com a produção de quimiocinas como KC e MIP-2, importantes para o influxo de neutrófilos<sup>77</sup>. Da mesma forma, o TLR2 está envolvido na produção de TNF- $\alpha$  e MIP-2<sup>80</sup> e IL-12 e IFN- $\gamma$ <sup>81</sup>. O TLR2 na candidíase experimental parece estar envolvido com a produção de IL-10. Na paracoccidiodomicose. Ferreira et al<sup>92</sup> relataram que em animais suscetíveis ao fungo, ocorre uma indução de células regulatórias que produzem IL-10 e que é dependente de ligação ao TLR2.

Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir que o Pb18 aumenta a expressão de TLR2 e utiliza-se do TLR4 para ser reconhecido e penetrar nos neutrófilos. No entanto, esse processo não resulta em aumento da atividade antifúngica direta dessas células. Por outro lado sugerem que esses receptores podem mediar a produção de IL-10 e IL-8 por essas células.

Na paracoccidiodomicose, como ocorre para outras infecções, à produção de IL-10 por monócitos e outras células em resposta ao *P. brasiliensis* tem sido considerada como um mecanismo de escape do fungo da

resposta imune do hospedeiro. Essa citocina é encontrada em altas concentrações no soro<sup>139</sup> e em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes<sup>144-145</sup>. Adicionalmente, monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose liberam espontaneamente altas concentrações dessa citocina *in vitro*<sup>146</sup>. Em modelo experimental da micose os animais suscetíveis produzem maiores níveis de IL-10 quando comparados aos resistentes<sup>32</sup>. Trabalhos em nosso laboratório têm demonstrado que essa citocina inibe a atividade fungicida *in vitro* de monócitos e neutrófilos humanos ativados com TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  respectivamente<sup>99, 147</sup>.

Dentro deste contexto, podemos discutir que o TLR2 e principalmente o TLR4 são usados pelo *P. brasiliensis* para entrar nos neutrófilos e possivelmente em outras células fagocitárias, para escapar das funções efetoras dessas células. Um desses mecanismos de escape envolveria a produção de IL-10. No entanto, não podemos descartar a atuação da IL-10 como um mecanismo de proteção, no sentido de controlar a resposta inflamatória excessiva produzida pelas citocinas ativadoras. Em trabalho recente foi demonstrada a participação de TLR2, TLR4 e dectin-1 no reconhecimento e internalização do *P. brasiliensis* com consequente ativação das funções de neutrófilos. No entanto, a cepa menos virulenta do fungo foi reconhecida preferencialmente por TLR2 e dectin-1, com produção balanceada de TNF- $\alpha$  e IL-10. Por outro lado, a cepa mais virulenta induziu somente a produção de TNF- $\alpha$ . Os autores discutem que a cepa menos virulenta através da produção de IL-10 induziria uma resposta mais controlada, benéfica para o hospedeiro<sup>148</sup>.

Em relação à IL-8 trabalhos em nosso laboratório<sup>149</sup> mostraram que essa citocina está envolvida em um processo anti-apoptótico dos neutrófilos, resultando em um atraso da morte dessas células, processo que poderia favorecer a sobrevivência do fungo intracelularmente. Adicionalmente, estudos mostraram o envolvimento do TLR4 na inibição da apoptose de neutrófilos, via produção de IL-8<sup>150-151</sup>. Dentro deste contexto, podemos considerar que a indução da produção de IL-8 é via TLR2 e principalmente TLR4, da mesma forma que a produção de IL-10, pode ser considerada como um provável mecanismo de escape das funções dos neutrófilos.

Em conjunto, os resultados sugerem que a interação do Pb18 com neutrófilos humanos via TLR2 e TLR4 pode ser considerada como um mecanismo de patogenicidade do fungo. Estudos futuros devem ser realizados com o objetivo de elucidar melhor esses mecanismos.

## 8. CONCLUSÕES

8.1. As citocinas GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  aumentaram a expressão de TLR2 e TLR4 por neutrófilos humanos.

8.2. O Pb18 aumentou a expressão de TLR2, exercendo um efeito aditivo ao das citocinas. Ao contrário, o Pb18 inibiu a expressão de TLR4 por essas células.

8.3. As citocinas GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  aumentaram a atividade fungicida de neutrófilos humanos contra o Pb18. No entanto, esse aumento não esteve associado à modulação de TLR2 e TLR4, induzida por essas citocinas e/ou pelo fungo.

8.4. As citocinas GM-CSF, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  aumentaram a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos humanos. O Pb18 aumentou a expressão desse metabólito, exercendo um efeito aditivo ao das citocinas. No entanto, esse processo não resultou da modulação de TLR2 e TLR4 por essas citocinas e/ou fungo.

8.5. A ativação dos neutrófilos com GM-CSF e TNF- $\alpha$  resultou em um aumento significativo na produção de IL-8. Ao contrário, essa citocina não foi detectada após ativação com IL-15 e IFN- $\gamma$ .

8.6. A ativação dos neutrófilos com todas as citocinas não resultou em um aumento significativo na produção de IL-10.

8.7. O Pb18 estimulou as células a produzirem tanto IL-8, como IL-10.

8.8. O efeito das citocinas e do Pb18 sobre a produção de IL-8 e IL-10 envolveu a participação de TLR2 e principalmente TLR4.

## 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Restrepo A, Tobón AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 3062–8.
2. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984;46:346-53.
3. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens to conidium- to- yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 1988;56:711-3.
4. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *P. brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:7659-63.
5. Stover EP, Schar G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast- form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 1986;51:1999-203.
6. Lacaz CS. South American Blastomycosis. *An Fac Med São Paulo*. 1956;29:1-120.
7. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis*. 1989;4:185-220.
8. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993;5:115-49.
9. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p.233-58.
10. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Ciênc Cult*. 1994; 46:455-61.
11. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco MF, Lacaz CS,

- Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Flórida, USA: CRC Press; 1994. p.175-86.
12. Peraçoli MTS, Parise-Fortes M, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995;37:129-36.
  13. Calich VLG, Costa TA, Felonato M, Arruda A, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia. 2008; 165: 223-36.
  14. Walsh TJ, Roilides E, Cortez K, Kottlilil S, Bailey J, Lyman CA. Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2005;43:S165-72.
  15. Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Haematol. 2005;129:583-96.
  16. Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. Curr Pharm Biotechnol. 2000;1:235-51.
  17. Brummer E, Hanson LH, Terstrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. Infect Immun. 1989;57:2289-94.
  18. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. J Med Microbiol. 1994;40:159-64.
  19. Goihman-Yahr M, Isturiz G, Rotthenberg A. Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomycosis. Interciencia. 1990;15:200-5.
  20. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. *In vitro* and *in vivo* activation of pulmonary macrophages by IFN- $\gamma$  for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitides*. J Immunol. 1988;140:2786-9.
  21. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. Infect Immun. 1992;60:2096-100.
  22. Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens D, Restrepo A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J Med Vet Mycol. 1992;30:161-8.

23. Carmo JPM, Peraçoli MTS, Calvi AS, Dias LA, Soares AMVC, et al. Inhibition of unprimed human monocytes oxidative burst by high-virulent strain *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of prostaglandins. *Annu Rev Biomed Sci.* 2002; 93-3.
24. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003;5:107-13.
25. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF- $\alpha$  activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006;44:363-8.
26. Gonzales A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000;68:2546-52.
27. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Soares AMVC. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. *Mycopathologia.* 2008;166:17-23.
28. Dunn PI, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun.* 1991;59:2892-900.
29. Levitz SM, North EA. Gamma interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1996;64:1595-9.
30. Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions. *Clin Exp Immunol.* 1993;93:189-94.
31. Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. A role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol.* 2002;40:377-82.
32. Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:615-23.
33. Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FR, Fazioli Rdos A, Vaz CA, et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by

- Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. Clin Immunol. 2002;103:185-95.
34. Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the *in vitro* antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. Cytokine. 2002;18:149-57.
  35. Calich VL, Coppi Vaz CA, Burguer E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. J Exp Pathol. 1985;66:585-94.
  36. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* infect mice is modulated by interferon-gamma. Am J Pathol. 2003;163:583-90.
  37. Franco M, Montenegro MRG. Anatomia Patológica. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidioidomycose. São Paulo: Sarvier-EDUSP; 1982. p.97-117.
  38. Figueiredo F, Silva CL, Alves LCM, Rossi MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. Braz J Med Biol Res. 1986;10: 277-90.
  39. Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster morphology, ultrastructure and correlation of the lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. Mycopathologia. 1979;67:131-41.
  40. Kerr IB, Araripe PCO, Lenzi HL. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1988;30:336-50.
  41. Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. J Leukoc Biol. 2006;79:1202-13.
  42. Baggiolini M, Walz A, Kunzel SL. Neutrophil-activating peptide 1 interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest. 1985;84:1045-9.
  43. Balazovich KJ, Almeida HI, Boxer LA. Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. J Lab Clin Med. 1991;118:576-84.
  44. Musso T, Calosso L, Zucca M. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. Infect Immun. 1998;66:2640-7.

45. Nathan CF. Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggered by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood*. 1989;73:301-6.
46. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino Jr MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1985;135:2069-73.
47. Steinbeck MJ, Roth JA. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev Infect Dis*. 1989;11:549-68.
48. Weisbart RH, Golde DW, Clark SC, Wong GG, Gasson JC. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature*. 1985;314:361-3.
49. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;36:603-8.
50. Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VL, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. *J Leukoc Biol*. 1996;59:526-33.
51. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999;37:261-7.
52. Kurita N, Oarada M, Brummer E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol*. 2005;43:417-22.
53. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2000;38:177-82.
54. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi AS, Peraçoli MT, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol*. 2007;45:27-33.
55. Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MTS, Soares AMV. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine*. 2007;41:48-53.

56. Parker LC, Whyte MKB, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leucocyte Biol.* 2005;77:886-92.
57. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003;102:2660-9.
58. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:13-9.
59. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of toll-like receptor proteins. *Life Sci.* 2000;68:241-58.
60. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol.* 2004;42:485-98.
61. Lamaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86:973-83.
62. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient mice and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol.* 2000;165:5392-6.
63. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9:525-32.
64. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997;91:295-8.
65. Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via TLR2. *J Immunol.* 2001;166:2444-50.
66. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005;11:653-8.
67. Abbas AK, Lichtman AH, editors. Innate Immunity. In: *Cellular and molecular immunology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 2003. cap. 12, p.275-97.
68. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16:3-9.
69. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol*

- Med. 2007;13:460–9.
70. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132:344–62.
  71. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segl DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166:249-55.
  72. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-80.
  73. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13766-71.
  74. Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- $\alpha$  release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol*. 2001;166:4620-6.
  75. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, Van Krieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppress immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172:3712-8.
  76. Calich VLG, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV, et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;53:1-7. Epub 2008 Apr 1.
  77. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002;185:1483-9.
  78. Gil ML, Gozalbo D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeast and hyphae. *Microbes Infect*. 2006;8:2299-304.
  79. Murciano C, Villamón E, Gozalbo D, Roig P, Oconnor JE, Gil ML. Toll-like receptors 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol*. 2006;44:149-57.

80. Villamón E, Gozalbo D, Roig P, Murciano C, O'Connor JE, Fradelizi D, et al. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in Candida-induced production of cytokines. *Eur Cytoline*. 2004;15:263-71.
81. Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptors 2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect*. 2004;6:1-7.
82. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol*. 2004;173:7406-15.
83. Marr KA, Balajee SA, Hawn TR, Ozinsky A, Pham U, Akira S, et al. Differential role of MyD88 in macrophage-mediated response to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun*. 2003;71:5280-6.
84. Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, Catania MR, et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*. 2005;35:870-8.
85. Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, Levitz SM. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans in vivo*. *Infect Immun*. 2004;72:5373-82
86. Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, et al. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:148-54.
87. Wang JE, Warris A, Ellingsen EA. Involvement of CD14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun*. 2001;69:2402-6.
88. Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latgé JP, Michan A, Loeffler J, et al. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cell via Toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*. 2004;125:392-9.
89. Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like receptor TLR2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*. 2003;5:561-7.
90. Dubordeau M, Athman R, Balloy V. *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol*. 2006;177:3994-4001.

91. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* 2003;188:320-6.
92. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin -10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanism of susceptibility. *J Infect Dis.* 2007;196:1108-15.
93. González A, Yáñez A, Gozalbo D, Gil ML. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54:365-74.
94. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLRs) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:5998-6004
95. Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, et al. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol.* 2001;69:474-81.
96. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Grosselin K, Newburger PE, et al. Role of toll-like receptor-2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin-8 response in neutrophils. *Blood.* 2002;100:1860-8.
97. O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci.* 2008;5:1-8.
98. Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS, 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;102:480-5.
99. Kurita N, Sano A, Coelho KIR, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. Na improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1993;31:201-5.
100. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980;36:61-70.

101. Pick E, Mizel D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 1981;46:211-26.
102. Godfrey KAM. *Statistic in practice. Comparing the means of several groups*. *N Engl J Med*. 1985;313:450-6.
103. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peraçoli MT, et al. Effect of IL-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol*. 2007;51:73-80.
104. Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*. 2002;218:87-94.
105. Almeida SR, Unterkircher CS, Camargo ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med Mycol*. 1998;36:405-11.
106. Jiménez Mdel P, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, Garcia LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp 1 congenic macrophage lines. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:56-66.
107. Calich VLG, Kipnis TL, Mariano M, Fava Netto, C, Dias da Silva, W. The activation of complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*. Its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. *Clin Immunol Immunopathol*. 1979;12:20-30.
108. Munk ME, Kajdacsy-Balla A, Del Negro G, Cuce LC, Da Silva WD. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1992;30:489.
109. Di Carlo, FJ, Fiore, JV. On the composition of zymosan. *Science*. 1958;127:756-7.
110. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Immunology*. 2007;37:467-78.
111. Bazzoni F, Cassatella MA, Laudanna C, Rossi F. Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*. 1991;50:223-8.

112. Takeichi O, Saito I, Tsurumachi T, Moro I, Saito T. Expression of inflammatory cytokine genes in vivo by human alveolar bone-derived polymorphonuclear leukocytes isolated from chronically inflamed sites of bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1996;58:244-8.
113. Loyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today.* 1992;13:169-72.
114. Palma C, Cassone A, Serbousek D, Pearson CA, Djeu JY. Lactoferrin release interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1992;60:4604-11.
115. Mianji S, Hamasaki Y, Yamamoto S, Miyazaki S. Inhibition by dexamethasone of the lipopolysaccharide-induced increase in IL-6 mRNA abundance and IL-6 production in human polymorphonuclear leukocytes. *Int J Immunophatol.* 1996; 18:339-46.
116. Cicco NA, Lindemann A, Content J, Vandebussche P, Lubbert M, Gauss J, et al. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood.* 1990;75:2049-52.
117. Arnold R, Scheffer B, Konig B, Konig W. Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (Hep-2) cells. *Infect Immun.* 1993; 61: 2545-52.
118. Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Koziel TR. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokines release by human neutrophil. *Infect Immun.* 1996;64:2897-903.
119. Lindemann A, Riedel D, Oster W, Ziegler-Heitbrock HW, Mertelsmann R, Hermann F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokines secretion by human polymorphonuclear leucocytes. *J Clin Invest.* 1989;83:1308-12.
120. Dubravec D, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Med Sci.* 1990;87:6758-61.

121. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM. Neutrophils CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1993;150:5556-65.
122. Mandi Y, Endresz V, Krenacs L, Regely K, Degre M, Beladi I. Tumor necrosis factor production by human granulocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;96:102-6.
123. Wahlgren M, Abrams JS, Fernandez V, Bejarano MT, Azuma M, Torii M, et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells and secretion of cytokines (IL-1- $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF). *Scand J Immunol.* 1995;42:626-36.
124. Djeu JY, Serbousek D, Blanchard DK. Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1990;76:1405-9.
125. Torosantucci A, Chiani P, Quinti I, Ausiello CM, Mezzaroma I, Cassone A. Responsiveness of human polymorphonuclear cells (PMNL) to stimulation by a mannoprotein fraction (MP-F2) of *Candida albicans*; enhanced production of IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by MP-F2-stimulated PMNL from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol.* 1997;107:451-7.
126. Strieter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, et al. Cytokines-induced neutrophil derived interleukin-8. *Am J Pathol.* 1992;141:397-407.
127. Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil activating peptide-1/interleukin 8. *J Exp Med.* 1993;173:771-4.
128. Cassatella MA, Guasparri I, Ceska M, Bazzoni F, Rossi F. Interferon- $\gamma$  inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology.* 1993;78:177-84.
129. Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim J, Zheng H, Daniel D, et al. Regulation of neutrophil interleukin-8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *J Cell Physiol.* 1993;154:478-85.
130. Hachicha M, Naccache PH, McColl SR. Inflammatory microcrystal differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin-8 by human neutrophil: A possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis. *J Exp Med.* 1995;182:2019-25.

131. McCain RW, Dessypris EN, Christian JW. GM-CSF stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8:58-34.
132. Wei S, Liu JH, Blanchard DK, Djeu JY. Induction of IL-8 gene expression in human polymorphonuclear neutrophils by recombinant IL-2. *J Immunol*. 1994;152:3630-6.
133. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, Dipietro LA, Elnor VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Sciences*. 1992;258:1798-801.
134. Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: Modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*. 1996;88:3176-84.
135. Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon JM. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- $\beta$ ) of IL-8 production by LPS and or TNF- $\alpha$ -activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm*. 1996;5:334-40.
136. McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 activates. *Blood*. 1998;92:4828-35.
137. Arnold R, Koing W. Interleukin-8 release from human neutrophils after phagocytosis of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol*. 1998;47:55-62.
138. Hachicha M, Rathanaswami P, Naccache PH, McColl RR. Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. *J Immunol*. 1998;160:449-54.
139. Riedel DD, Kaufmann SHE. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun*. 1997;65:4620-3.
140. McColl SR, Roberge CJ, Larochelle B, Gosselin J. EBV induces the production and release of IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in human neutrophils. *J Immunol*. 1997;159:6164-8.
141. Au BT, Williams TJ, Collins PD. Zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils involves activation via the CD11b/CD18 receptor and endogenous platelet-activating factor as an autocrine modulator. *J Immunol*. 1994;152:5411-9.

142. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 1999;73:369-509.
143. Formari MC, Bava AJ, Guerenio MT, Berardi VE, Silaf MR, Negroni R, et al. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:1036-8.
144. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PMO, Blotta MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002;4:139-44.
145. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001;13:248-52.
146. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques AS, et al. Production of pro and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003;5:413-8.
147. Soares AMVC, Silva WB, Rodrigues DR. IL-10 but not TGF- $\beta$  inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. *Annu Rev Biomed Sci.* 2002;Suppl: 89.
148. Bonfim CV, Mamoni RL, Souza MH, Blotta L. TLR2, TLR4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009;17:1-12.
149. Acorci MJ, Dia-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8. *Scand J Immunol.* 2008;69:73-9.
150. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol.* 2003;170:5268-75.
151. Sabroe I, Dower SK, Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis.* 2005;41:421-6.