



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**GABRIELA SPOLTI DA SILVA**

**USO DE LIGANTES DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO (PRRs)  
NA MODULAÇÃO NA ATIVIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS  
INFECTADAS COM *Paracoccidioides brasiliensis***

CEILÂNDIA, DF  
2016

GABRIELA SPOLTI DA SILVA

**USO DE LIGANTES DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO  
PADRÃO (PRRs) NA MODULAÇÃO NA ATIVIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS  
MURINAS INFECTADAS COM *Paracoccidioides brasiliensis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção de grau  
de Farmacêutico generalista na Universidade  
de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Ceilândia, DF

2016

GABRIELA SPOLTI DA SILVA

**USO DE LIGANTES DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO  
PADRÃO (PRRs) NA MODULAÇÃO NA ATIVIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS  
MURINAS INFECTADAS COM *Paracoccidioides brasiliensis***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Rodrigo Haddad  
(FCE/ Universidade de Brasília)

Ceilândia, DF  
2016

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os brasileiros portadores de paracoccidiodomicose. Essa doença tão séria e infelizmente negligenciada, na esperança de que, no futuro, com o desenvolvimento das pesquisas, essas pessoas tenham melhores tratamentos e condições de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Maria Augusta Spolti e Salatiel Oliveira da Silva, por sempre terem acreditado em mim, me apoiado e me amado. Por toda a educação, ensinamentos, inspiração e exemplos de vida que me foram passados.

Ao meu orientador, Aldo Henrique Tavares, por todo o incentivo, conhecimento, conselhos, paciência e amizade.

A todos os professores e colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), por terem me recebido tão bem e acompanhado minha trajetória de mais de dois anos nesse local. Em especial ao Pedro Henrique Miranda Bürgel pela ajuda na execução deste trabalho e à Dawanne Aparecida Silva, por ser minha companheira de bancada e de experiências e estar ao meu lado nessa pesquisa e aprendizado.

Aos meus amigos gaúchos, que sinto tanta falta. Por apoiarem e entenderem minha escolha e jamais esquecerem de mim, mesmo com esses 2500 quilômetros de distância entre nós. Aos amigos que a universidade me deu, por estarem comigo em todos os momentos de perrengues, de preocupações e angústias. E principalmente pelos momentos de união e felicidade.

Agradeço imensamente aos meus familiares por todo amor e compreensão, presencialmente ou à distância, que deixaram essa jornada tão mais leve.

Agradeço à Fernanda Guilhelmelli Costa e ao Marco Antônio de Oliveira, do laboratório Maristela Oliveira de Azevedo, por me ensinarem uma técnica essencial ao meu trabalho, a RT-PCR.

“Eu faço parte dos que pensam que a ciência é belíssima.” Marie Curie

## RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, adquirida pela inalação de propágulos da forma miceliana, presentes no solo. O desenvolvimento da doença depende de fatores do fungo, como mecanismos de evasão, além de fatores do hospedeiro. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa com predominância de linfócitos T auxiliares do tipo 1 é considerada adequada e associada a resistência à PCM em modelos murinos e em humanos. A resposta adaptativa é iniciada e direcionada principalmente por células dendríticas (DCs) após o reconhecimento de padrões moleculares de patógenos. Assim, este trabalho avalia a capacidade imunomodulatória de três agonistas de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) sobre DCs. Para isso DCs foram infectadas com *P. brasiliensis* e tratadas com agonistas de PRRs Zymosan, Zymosan Depletado e Pam3csk4, que são respectivamente ligados à Dectina-/TLR-2, somente Dectina-1 e somente TLR-2. Observou-se que, em geral, o tratamento induz a uma modulação de diversas atividades de DCs infectadas com o fungo. Foi observado o aumento da produção de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , a indução significativa da maturação das DCs, que em geral é reduzida pelo *P. brasiliensis*. Além disso, o tratamento induziu o desenvolvimento de um perfil de citocinas associadas a resposta com predominância de linfócitos Th1. Ainda foi observada a capacidade do fungo de inibir a produção de IL-12p70 por DCs pela redução da transcrição do gene IL12A, que codifica a subunidade específica p35 dessa citocina.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*; células dendríticas, agonistas de PRRs, IL-12, IFN- $\gamma$

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It is acquired by the inhalation of propagules of the mycelial form from the soil. The development of the disease depends on fungus features such as evasion mechanisms, and of host factors. In this context, the development of an adaptive immune response with a predominance of type 1 helper T lymphocytes is considered adequate and associated with resistance to PCM in murine models and in humans. The adaptive response is initiated and directed mainly by dendritic cells (DCs) after the recognition of pathogens molecular patterns. In this context this work evaluates the immunomodulatory capacity of three pattern recognition receptor (PRR) agonists on DCs during interaction with *P. brasiliensis*. DCs were infected with *P. brasiliensis* and treated with PRRs agonists Zymosan, Zymosan Depleted and Pam3csk4, which are bound respectively to Dectin-1/TLR-2, only Dectin-1 and only to TLR-2. It was observed that, in general, the treatment induces a modulation of various functions of fungal infected DCs. It was observed increased production of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  and significant induction of maturation DCs, which in general is reduced by *P. brasiliensis*. Furthermore, the treatment induced the development of a cytokines profile associated with Th1 response predominance of lymphocytes. Furthermore, this work demonstrated the capacity of the fungus to inhibit IL-12p70 production by DCs, via reduction of the IL12A gene transcription that encodes the specific p35 subunit of this cytokine.

**Key-words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, dendritic cells, PRRs' agonists, IL-12, IFN- $\gamma$

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Análise morfológica do *Paracoccidioides* em microscopia eletrônica.

**Figura 2:** Subpopulações de linfócitos T CD4+ em infecções fúngicas.

**Figura 3.** Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (C) e IL-12p70 (D) do sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectados ou não com *P. brasiliensis* (Pb) e/ou tratados com os agonistas de PRRs.

**Figura 4.** *P. brasiliensis* inibe a produção de IL-12p70 induzida por LPS.

**Figura 5.** *P. brasiliensis* inibe a subunidade p35 e não p40 de IL-12 em BMDCs.

**Figura 6.** Nível das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12 p40 e IL12p70 no sobrenadante de culturas de BMDCs WT, Dec-1 KO, TLR2KO ou WT+Anti-mincle infectadas com *P. brasiliensis* e WT+LPS.

**Figura 7.** Histogramas representativos da análise de expressão dos marcadores de maturação CD80 e CD86 de BMDC infectadas por *P. brasiliensis* tratadas ou não com agonistas de PRRs PAM3CSK4, Zymosan e Zymosan depletado por meio de citometria de fluxo.

**Figura 8.** Quantificação de IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-17 no sobrenadante de co-culturas de BMDC infectadas por *P. brasiliensis* e esplenócitos tratadas com agonistas de PRRs.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Iniciadores para genes murinos utilizados nos ensaios de RT-qPCR

## LISTA DE ABREVIÇÕES

APC	Células apresentadoras de antígenos
BMDC	Células dendríticas provenientes de medula óssea
CLR	Receptores de lectina do tipo C
DC	Célula Dendrítica
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRF1	Fator regulatório de interferon
kDa	Quilodalton
KO	Que não expressa
LPS	Lipopolissacarídeo
NLRP3	Receptor do tipo NOD3
nm	Nanômetro
NK	Células assassinas naturais
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCM	Paracoccidiodomicose
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
TLR	Receptor do tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Th	Linfócito T auxiliar
WT	Tipo selvagem

## SUMÁRIO

<b>1 – Introdução</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 – A Paracoccidioidomicose (PCM) e seu agente etiológico</b> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	<b>13</b>
<b>1.2 – O reconhecimento fúngico pelo sistema imune</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 – Células dendríticas e sua influência na imunidade adaptativa</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 – A importância dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) ....</b>	<b>18</b>
<b>2 – Justificativa</b> .....	<b>22</b>
<b>3 – Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 - Objetivo geral</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 – Objetivos específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4 - Materiais e Métodos</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 – Animais</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2 - Paracoccidioides brasiliensis</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 - Reagentes</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 - Obtenção de Células Dendríticas</b> .....	<b>25</b>
<b>4.5 - Infecção das células dendríticas com <i>P. brasiliensis</i></b> .....	<b>25</b>
<b>4.6 - Dosagem de citocinas da cultura de células dendríticas infectadas</b> .....	<b>26</b>
<b>4.7 - Co-cultivo de células dendríticas com esplenócitos</b> .....	<b>26</b>
<b>4.8 - Determinação dos níveis de transcritos de IL-12p35</b> .....	<b>26</b>
<b>4.9 - Citometria de Fluxo</b> .....	<b>28</b>
<b>4.10 - Análise estatística</b> .....	<b>29</b>
<b>5 - Resultados e Discussão</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 - Interação entre BMDCs, <i>P. brasiliensis</i> e agonistas de PRRs</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2 - A inibição de IL-12p70 em BMDCs causada por <i>P. brasiliensis</i></b> .....	<b>33</b>
<b>5.3- Agonistas de PRRs estimulam a maturação de BMDCs</b> .....	<b>36</b>
<b>5.4 - A influência dos agonistas de PRRs no perfil de resposta imune adaptativa</b> .....	<b>39</b>
<b>6 - Conclusão</b> .....	<b>44</b>
<b>7 – Referências Bibliográficas</b> .....	<b>46</b>
<b>8 - Anexo 1</b> .....	<b>54</b>

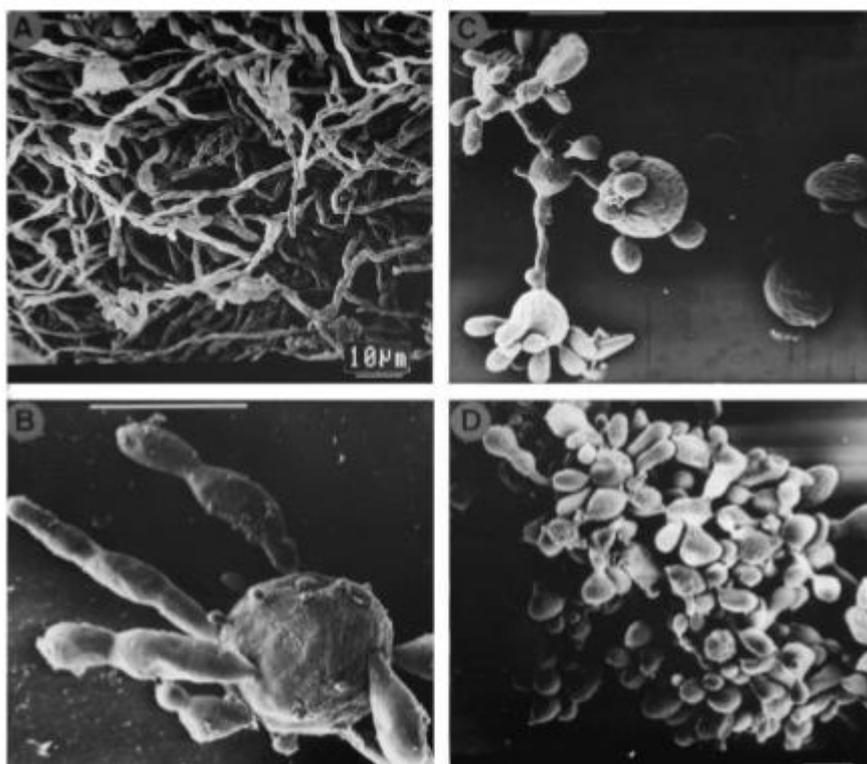
## 1 – Introdução

### 1.1 – A Paracoccidioidomicose (PCM) e seu agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis*

A PCM é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, presente desde a Argentina até o México, e é causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. No Brasil, esta é a micose sistêmica que causa maior mortalidade e a oitava doença crônica/recorrente fúngica ou parasitária mais frequente (COLOMBO *et al*, 2011; COUTINHO *et al*, 2015). Essa doença não é de notificação compulsória, fato que favorece que ela seja negligenciada e subnotificada. Além disso, as regiões endêmicas geralmente têm um sistema precário de diagnóstico. Este ponto é de extrema relevância, pois a PCM pode ser facilmente confundida com tuberculose (por possuírem sintomas e perfis de imagens de Raio-X semelhantes), requerendo diagnóstico diferencial. Aproximadamente 14% dos pacientes com PCM possuem de fato coinfeção com *Mycobacterium tuberculosis*, o que dificulta a identificação de ambos os patógenos (COUTINHO *et al*, 2015). O Brasil é o centro endêmico, contando com 80% dos casos relatados, sendo os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso os mais afetados. Além desses estados, na região Norte, notadamente a Amazônia, com a abertura de novas fronteiras agrícolas também contribui para o atual panorama da micose. Acometendo principalmente a população rural, devido possivelmente ao contato contínuo com o habitat do fungo, que é o solo (COUTINHO *et al*, 2015).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico presente no solo. Ele existe na forma de micélio à temperatura ambiente, produzindo conídios que agem como propágulos infecciosos. Uma vez que esses propágulos são inalados pelo hospedeiro, o fungo consegue atingir os pulmões, onde ele irá mudar para a forma de levedura devido à temperatura de 37°C. Essa mudança pode ser reproduzida *in vitro* como mostrado na Figura 1. Tal transição é indispensável para que o fungo se estabeleça no pulmão, pois acontecem alterações metabólicas, fisiológicas e principalmente em sua parede celular. Há o aumento da quitina e a mudança da proporção dos polímeros de glicose de  $\beta$ -1,3-glicana e  $\alpha$ -1,3-glicana

(que passa a ser sintetizada e se localiza acima da  $\beta$ -1,3-glicana, que é mais imunoestimulatória) (BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002). Além da mudança estrutural da parede celular, outro aspecto importante para o desenvolvimento fúngico é sua capacidade de adesão às células do hospedeiro. Já foi observado que o antígeno do *P. brasiliensis*, gp43, que age como fator de virulência, participa do processo de degradação de citoqueratinas, para a perda da característica filamentosa das células epiteliais do pulmão, facilitando a invasão do fungo. (PUCCIA *et al*, 2011; DE OLIVEIRA, *et al*, 2015)



**Figura 1:** Análise morfológica do *Paracoccidioides* em microscopia eletrônica. Mostrando a transição da forma de micélio (A) para levedura (D) em 26°C e 36°, respectivamente. (B) e (C) mostram as mudanças morfológicas durante essa transição. (DA SILVA *et al*, 1999)

Um fato interessante da PCM é que ela acomete muito mais homens (82%) que mulheres. Isso se deve a duas razões: (1) fator de exposição, por ser um fungo encontrado principalmente em zona rural as pessoas que trabalham diretamente no campo estão mais expostas e em sua maioria são homens; (2) estrógenos, o fator hormonal presente nas mulheres dificulta a transição da forma micelar do fungo para

levedura, o que dificulta por sua vez, o desenvolvimento da doença (BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002).

A PCM acomete principalmente indivíduos imunocompetentes e a susceptibilidade a essa infecção fúngica é bastante variável, pois a defesa imunológica é complexa e multifatorial. Algumas pessoas podem não desenvolver a doença e permanecer ao longo da vida assintomáticas. Tal fenômeno geralmente está associado a uma formação adequada de granuloma no pulmão, liberação de citocinas próinflamatórias (como IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6 e IFN- $\gamma$ ) e produção de óxido nítrico, características que inibem a disseminação fúngica (CALICH *et al*, 2008; DE CASTRO *et al*, 2013). Por outro lado, há pacientes que acabam desenvolvendo a doença, o que pode ocorrer de duas formas: aguda ou crônica. A forma crônica leva de meses a anos para se desenvolver e é o perfil de cerca de 90% dos casos (BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002). É iniciada por lesões pulmonares que podem disseminar para outros órgãos e tecidos, como mucosas (principalmente da faringe e laringe), ápice dos dentes, pele, linfonodos e glândulas adrenais. O fígado, baço e sistema nervoso central também podem ser acometidos se não houver tratamento. A forma aguda da PCM é mais severa, podendo ocorrer linfonodomegalia, hepatoesplenomegalia, sintomas digestivos, cutâneos e osteoauriculares (BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002; WANKE & AIDÊ, 2009; ROMANI, 2011). As formas aguda e crônica estão relacionadas com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-10 e a geração de uma resposta adaptativa com predominância de linfócitos Th2 (CALICH *et al*, 2008).

## **1.2 – O reconhecimento fúngico pelo sistema imune**

A ativação do sistema imunológico se inicia com o reconhecimento do microrganismo invasor. Tal processo ocorre devido ao fato de as células imunes possuírem receptores com a função de se ligarem a determinadas estruturas que são estranhas ao hospedeiro. Esses receptores são chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês pattern recognition receptors) e se ligam a antígenos do microrganismo chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês pathogen-associated molecular patterns). Em caso de

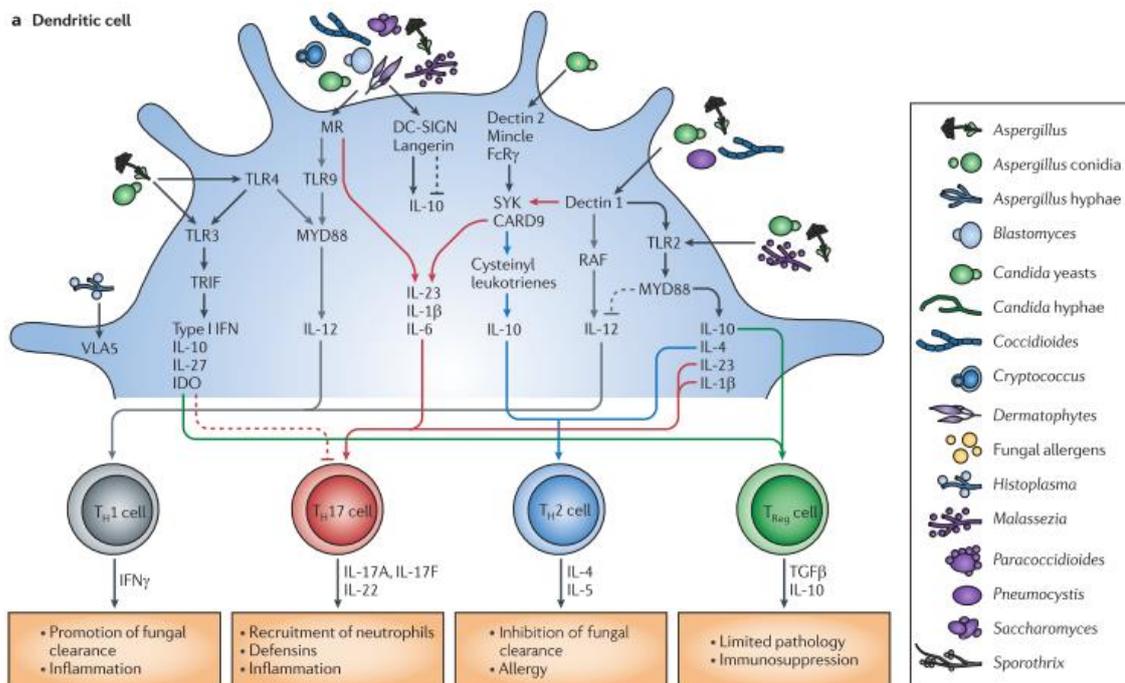
infecções fúngicas, os principais PAMPs são os componentes da parede celular: quitina,  $\beta$ -1,3-glicana e manana, enquanto os principais PRRs são pertencentes às classes receptores de lectina do tipo C (CLR, do inglês C-type lectin receptors) e receptores do tipo toll, (TLR, do inglês Toll like receptors). Esse processo de reconhecimento inicia a chamada resposta imune inata, que é principalmente mediada por atividade celular, envolvendo processos inflamatórios. Neutrófilos, monócitos, macrófagos são as principais células que reconhecem, fagocitam e medeiam a eliminação do microrganismo, enquanto células dendríticas fazem o processamento antigênico, iniciando a chamada imunidade adaptativa, basicamente mediada pela produção de citocinas, quimiocinas e produção de anticorpos para a eliminação do patógeno (ROMANI, 2011; KUMAR, KAWAI & AKIRA, 2011; ERWIG & GOW, 2016 ).

### **1.3 – Células dendríticas e sua influência na imunidade adaptativa**

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos profissionais (APC, do inglês antigen presenting cells). Imaturas, elas residem nos tecidos até reconhecerem um microrganismo para fazer o reconhecimento pelos seus PRRs, internaliza-lo e processa-lo. Quando o fazem, migram para os linfonodos, para realizar a apresentação do antígeno aos linfócitos T virgens. Assim, as DCs são tidas como um elo entre as imunidades inata e adaptativa (BANCHEREAU *et al*, 2000).

O processo de migração para o linfonodo é concomitante a outro processo imprescindível para essa célula: sua maturação. Mudanças importantes ocorrem nas DCs para que a apresentação do antígeno seja realizada: diminuição da sua capacidade de endocitose e fagocitose (pela diminuição dos receptores com essa função); aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como CD11b, CD40, CD58, CD80 e CD86, além do aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês major histocompatibility complex) de classe II, que é a molécula que realizará a apresentação do antígeno processado para o linfócito T CD4<sup>+</sup> virgem (BANCHEREAU *et al*, 2000; WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

A proliferação e a polarização das diferentes subpopulações de linfócitos T dependem do tipo de estímulo, do processamento, da apresentação de antígenos e consequentemente das citocinas secretadas pelas DCs maduras (SAID & WEINDL, 2015). Dentre as subpopulações de linfócitos T auxiliares, Th1 e Th2 são dois perfis diferentes, adequados para patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente. Essas populações estão associadas a padrões de citocinas distintos. A produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-18 está relacionada com a predominância de linfócitos Th1 e a consequente produção de IFN- $\gamma$ , que é uma citocina importante para regular a atividade das imunidades inata e adaptativa e um potente ativador da função microbicida de fagócitos, sendo essencial para a resistência contra bactérias, fungos e parasitas intracelulares. Já a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 estão relacionadas com a predominância de linfócitos Th2 (TRINCHIERI, 2013; CALICH *et al*, 2008). A figura 2 ilustra a produção de citocinas por células dendríticas e sua capacidade de induzir o desenvolvimento de diferentes subpopulações de linfócitos T.



**Figura 2:** Subpopulações de linfócitos T CD4+ em infecções fúngicas. A capacidade das células dendríticas responderem à diferentes combinações de PRRs-PAMPs com a ativação de diferentes

vias de sinalização, levando a produção de diversas citocinas distintas, que culminarão na indução de um tipo predominante de linfócitos T ou regulatórios (Adaptado de: ROMANI, 2011)

Na infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*, sabe-se que a resposta adequada ao hospedeiro tem o envolvimento de IL-12, para geração do perfil de linfócitos Th1 e produção de IFN- $\gamma$  e de IL-1 $\beta$  para auxiliar no controle do crescimento intracelular do fungo, além da diminuição da produção de citocinas relacionadas ao desenvolvimento de linfócitos Th2 (THIND, TABORDA & NOSANCHUK, 2015). Inclusive existem estudos mostrando a eficácia de vacina profilática e terapêutica em camundongos, utilizando um peptídeo derivado da proteína gp43 do fungo, baseada na sua habilidade de estimular a polarização da resposta via linfócitos Th1 (MAGALHÃES *et al*, 2011). A caracterização da infecção com *P. brasiliensis* em humanos também mostra que a resistência está relacionada com a resposta predominante de linfócitos Th1, enquanto a susceptibilidade à doença possui uma predominância de linfócitos Th2, induzida por IL-4 e IL-13, principalmente (DE CASTRO *et al*, 2013). Contudo, já foi descrito que o *P. brasiliensis* é capaz de comprometer a função de DCs, reduzindo seu processo de maturação, por reduzir a expressão de MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86, além de inibir drasticamente que essas células produzam IL-12, essencial para a indução da produção de linfócitos Th1 (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004). Por outro lado, altos níveis IL-10 e TGF- $\beta$  exercem atividade supressiva na imunidade celular, favorecendo a imunidade humoral e o desenvolvimento da predominância de linfócitos auxiliares reguladores (Treg), que não induzem a ativação de macrófagos (DE CASTRO *et al*, 2013). O perfil de linfócitos Th17 é considerado um mecanismo efetor contra infecções fúngicas e é encontrado na área de lesão de pacientes infectados com *P. brasiliensis* e com as formas aguda e crônica da doença (PAGLIARI *et al*, 2011).

#### **1.4 – A importância dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs)**

As células do sistema imunológico do hospedeiro expressam receptores de reconhecimento padrão, que reconhecem microrganismos invasores e iniciam determinadas cascatas de sinalização celular, culminando na transcrição de diversos genes a fim de eliminar o patógeno. Estes receptores podem estar localizados na

membrana celular ou mesmo no citoplasma e são classificados em diferentes famílias (ROMANI, 2011).

Uma das famílias mais importante para o reconhecimento fúngico é a família CLR. São receptores definidos como proteínas transmembranas, capazes de se ligar a maioria das espécies fúngicas que são patogênicas a humanos. Estão incluídos nessa família: Dectina-1, Dectina-2, Mincle, ICAM-3, MR (receptor de manose, do inglês manose receptor), entre outros. Dectina-1 é o principal receptor de  $\beta$ -1,3-glicana e induz a produção de citocinas anti e próinflamatórias. Isso ocorre porque esse receptor é capaz de ativar duas vias de sinalização distintas e independentes: SYK/CARD9 e RAF-1. Essas vias podem ter efeitos sinérgicos e tem por finalidade a ativação das vias canônicas e não canônicas do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que resulta na produção de eicosanoides e citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , entre outras. A importância desse receptor e suas vias de sinalização é muito grande, uma vez que já foi demonstrado que camundongos e humanos que não expressam Dectina-1 ou CARD9 geralmente apresentam susceptibilidade à doenças fúngicas (TAYLOR *et al*, 2007; FERWERDA *et al*, 2009; GLOCKER *et al*, 2009). A não expressão de Dectina1 e Dectina-2 está relacionada com a diminuição da resposta Th1 em camundongos, mostrando que há um sinergismo entre os dois receptores. O menor desenvolvimento de linfócitos Th1 pode estar relacionado com a susceptibilidade (ROBINSON *et al*, 2009). Dectina-2 é expressa por uma variedade de células mielóides, tais como macrófagos e DCs, e a sua expressão é aumentada durante a resposta inflamatória. Dectina-2 está envolvido no reconhecimento de polissacáridos de manose como  $\alpha$ -manana, e a sua atividade leva à produção de várias citocinas e quimiocinas, incluindo aquelas pró-inflamatórias relacionadas com linfócitos Th1, Th17 (KERSCHER *et al*, 2013). Dectina-2 reconhece uma variedade de fungos patogênicos, incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, e *Cryptococcus neoformans* (SATO *et al*, 2006; MCGREAL *et al*, 2006) e desempenha um papel crítico na defesa do hospedeiro contra a infecção com *C. albicans* por meio de indução a resposta imune mediada por Th17 (SAIJO *et al*, 2010), apesar de não ter seu papel bem descrito na infecção com *P. brasiliensis*. Recentemente descrito, Dectina-3 é também expresso em fagócitos e reconhece  $\alpha$ -mananas. Este PRR participa no reconhecimento dos fungos *C. albicans* e *Fonsecaea prodosoi*

(GRAHAM *et al*, 2012; WÜTHRICH *et al*, 2015). Importante notar que Dectina-3 forma heterodímeros com Dectin-2 e ainda induz a co-expressão de Mincle na superfície celular (ZHU *et al*, 2013). Já o receptor Mincle reconhece estruturas de manose e requer uma molécula coestimulatória para sua ativação, o FcR $\gamma$ . De forma semelhante à Dectina, este receptor induz a ativação de NF- $\kappa$ B pela via de sinalização SYK/CARD9 (ROMANI, 2011; HARDISON & BROWN, 2012; LANDMANN, WÜTHRICH & HOHL, 2012; WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

Outra família de PRRs é a TLR. Os receptores pertencentes à essa família são considerados os primeiros sensores de patógenos. TLR1,2,4,5 e 6 são expressos na membrana celular e reconhecem PAMPs de bactérias, fungos e protozoários. Enquanto TLR3,7,8 e 9 são expressos no compartimento de endocitose e reconhecem principalmente ácidos nucleicos (KUMAR, KAWAI & AKIRA, 2011). Após a ligação com antígenos os TLRs se dimerizam e dão início a sua cascata de sinalização, que envolve as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF, que irão produzir citocinas pró-inflamatórias, como IFNs e ativar o complexo NF- $\kappa$ B (WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012). TLR2, TLR4 e TLR9 são os principais TLRs envolvidos no reconhecimento de fungos, como mananas e DNA fúngico. Sabe-se que camundongos que não expressam MyD88, que participa da sinalização dos receptores dessa família, tem grande susceptibilidade à infecções com *Candida albicans*, *P. brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (ROMANI, 2011; HARDISON & BROWN, 2012).

Estudos recentes têm mostrado a importância do sinergismo entre receptores dessas duas famílias, o que vem sendo chamado de "cross-talk". A cooperação entre receptores melhor descrita é entre Dectina-1 e TLR-2 e este é um novo alvo para farmacoterapia e desenvolvimento de vacinas, por aumentar a ativação de NF $\kappa$ B em macrófagos e DCs (LANDMANN, WÜTHRICH & HOHL, 2012) e estimular o aumento da produção de citocinas de interesse, melhorando o perfil de resposta imune (HARDISON & BROWN, 2012). As vantagens desse "cross-talk" podem ser claramente observadas em alguns estudos. Foi mostrado que a administração exógena de agonistas de TLRs, melhora a resposta imune contra infecção murina por *Fonsecaea pedrosoi*, que naturalmente é apenas reconhecido por receptores do

tipo CLR, não TLR, auxiliando na eliminação do fungo (SOUSA *et al*, 2011). Outro estudo, envolvendo apenas diferentes agonistas de PRRs, mostra que a coestimulação dos receptores Dectina-1 e TLR-2 é muito importante para induzir a produção de IL-12 por células dendríticas humanas de neonatos, citocina não produzida em grande quantidade por essas células em situações normais (LEMOINE *et al*, 2015).

Dada a importância da estimulação desses receptores em infecções fúngicas, este trabalho avaliará o uso de ligantes de Dectina-1 e TLR-2, Zymosan, Zymosan Depletado e Pam3csk4, na modulação da atividade de células dendríticas infectadas com *P. brasiliensis*.

## 2 – Justificativa

A PCM é uma doença com a característica de cronicidade, requerendo um longo período de tratamento. Com isso, os casos de efeitos adversos e toxicidade, principalmente hepática, dos fármacos antifúngicos acabam reduzindo a adesão ao tratamento, que mesmo quando feito corretamente pode ter baixa eficácia. Tendo isso em vista, além do fato do aumento da resistência aos medicamentos por alguns isolados do *P. brasiliensis*, e do fato de não existir vacina para prevenção de doenças fúngicas, é necessária a busca por alternativas terapêuticas.

Nesse contexto, o uso de agonistas para o estímulo de PRRs e modulação da resposta imune tem sido cada vez mais estudado. Em pacientes portadores de PCM foi realizado um estudo na década de 90, que comparou o tratamento com antifúngicos ao tratamento com antifúngicos associado à administração intravenosa de glicana derivada da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Esse trabalho mostrou que o progresso clínico daqueles pacientes que receberam a glicana foi maior do que os que não receberam (com maior produção de TNF- $\alpha$  e aumento nos níveis de anticorpos) mesmo que o primeiro grupo tivesse inserido propositalmente os pacientes mais graves (MEIRA *et al*, 1996).  $\beta$ -1,3-glicana também foi utilizada associada a itraconazol (fármaco antifúngico) em caso de cromoblastomicose, uma doença fúngica causada por *Fonsecaea pedrosoi*. Em 6 anos de tratamento utilizando apenas o fármaco, o paciente não apresentou melhora clínica, mas em 6 meses de tratamento associado à  $\beta$ -1,3-glicana suas lesões reduziram consideravelmente (AZEVEDO *et al*, 2007).

Sabendo que a imunoestimulação com agonistas de PRRs pode ser clinicamente interessante e benéfica ao paciente, além de ter a capacidade de alterar o tipo de resposta imune adaptativa desenvolvida, pesquisas nessa linha são de grande importância para caracterizar o potencial de diferentes agonistas e estudar seu uso terapêutico na busca de novos tratamentos para doenças fúngicas.

### **3 – Objetivos**

#### **3.1 - Objetivo geral**

Avaliar a capacidade imunomodulatória e o potencial uso terapêutico dos agonistas de PRRs Zymosan, Zymosan Depletado e Pam3csk4 sobre células dendríticas infectadas com *Paracoccidioides brasiliensis*.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

- Avaliar a influência dos agonistas de PRRs na produção de citocinas por células dendríticas;
- Avaliar o impacto dos agonistas de PRRs no processo de maturação das células dendríticas;
- Avaliar a influência dos agonistas de PRRs no desenvolvimento dos diferentes perfis de populações de linfócitos T.

## **4 - Materiais e Métodos**

### **4.1 – Animais**

Foram utilizados camundongos selvagens (WT) da linhagem isogênica C57bl/6, que são susceptíveis à infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* (CALICH et al., 1985), machos, entre 8 e 12 semanas de idade. Também foram usados camundongos deficientes (KO) para os receptores TLR-2 e Dectina-1. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, em condições sanitárias com água e ração *ad libitum*. Os experimentos seguem as normas do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília com projeto aprovado número 117971/2014. (Anexo 1).

### **4.2 - Paracoccidioides brasiliensis**

A infecção das células foi realizada com o isolado virulento 18 do fungo *P. brasiliensis* (KASHINO et al, 1985). O mesmo é mantido em meio de cultura semissólido Fava-Neto (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, D-glicose 4%, ágar 1,8%, pH 7,2) em estufa a 37°C, sendo repicado semanalmente.

### **4.3 - Reagentes**

Os seguintes agonistas de PRRs foram utilizados: Pam3CSK4 (agonista de TLR-2/1), Zymosan (agonista de Dectina-1 e TLR-2) e Zymosan depletado (agonista de Dectina-1), todos foram adquiridos da Invivogen. As concentrações de uso para os testes *in vitro* foram as seguintes: Pam3CSK4 (300 ng/ml), Zymosan (20 µg/ml) e Zymosan depletado (100 µg/ml) a não ser quando especificado de outra maneira. Além desses agonistas, foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) derivado de *Escherichia coli* sorotipo O111:B4 (500 ng/ml) e anticorpo bloqueador anti-mincle (10µg/ml).

#### **4.4 - Obtenção de Células Dendríticas**

As células dendríticas utilizadas foram obtidas por meio de diferenciação de células provenientes de medula óssea (BMDC) conforme (LUTZ et al., 1999). Para tal, células de medula óssea foram coletadas do fêmur e tíbia dos camundongos, a partir da lavagem com meio RPMI.  $2 \times 10^6$  células de medula óssea foram cultivadas em volume de 10 mL de meio RPMI suplementado com HEPES (agente tamponante utilizado para a manutenção de pH fisiológico),  $\beta$ -mercaptoetanol (auxilia na proliferação celular), gentamicina (antimicrobiano para prevenir a contaminação da cultura), bicarbonato de sódio (auxilia no controle de pressão osmótica e na realização de potencial de ação celular) e GM-CSF (20 ng/mL) (fator de diferenciação e sobrevivência de monócitos e granulócitos) em placa de petri. Estas placas de petri foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. No terceiro dia de cultivo foram acrescentados mais 10 mL de meio RPMI suplementado. No sexto dia de cultivo metade do volume (10 mL) foi retirado e centrifugado, sendo o precipitado celular obtido ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI suplementado conforme descrito acima e recolocado novamente no meio de cultura original. No oitavo dia de cultivo células que não se apresentarem aderidas, células dendríticas, foram removidas do meio de cultura e utilizadas. Imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo indicou que 79% das células não aderentes eram positivas para CD11c e MHC II, caracterizando DCs, (dados não mostrados).

#### **4.5 - Infecção das células dendríticas com *P. brasiliensis***

Após a diferenciação, as DCs imaturas foram coletadas e infectadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* resuspensas em meio RPMI com a razão fagócito:levedura de 2:1 em placas de cultura de células de 6, 24 ou 48 poços. As culturas foram então incubadas a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas (ou conforme indicado) na presença ou não dos agonistas de PRRs, LPS e anticorpo anti-Mincle (o último introduzido na cultura 1 hora antes da infecção).

#### **4.6 - Dosagem de citocinas da cultura de células dendríticas infectadas**

O sobrenadante retirado da cultura após 24 horas foi centrifugado e estocado a -20°C. Posteriormente foi utilizado para dosagem de citocinas utilizando o ensaio imunoenzimático “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) do tipo sanduíche, sendo o segundo anticorpo associado à enzima estreptavidina (HRP), que se liga em seu substrato, biotina, gerando cor. As citocinas analisadas foram IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40, IL-13 e IL-17 seguindo as recomendações do fabricante dos kits Ready-SET-Go!® (eBioscience). As soluções de lavagem entre as etapas recomendadas (PBS 1X + Tween 20 0,05%) e de parada de reação (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) são preparadas manualmente no laboratório. Ao fim do ELISA, as placas são levadas ao espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) para leitura em 450 nm.

#### **4.7 - Co-cultivo de células dendríticas com esplenócitos**

Esplenócitos totais foram obtidos a partir do divulsionamento do baço de dois camundongos saudáveis e então adicionados às placas de culturas por 3 horas em meio RPMI para o enriquecimento de linfócitos T, que não aderem na placa como os macrófagos e linfócitos B. Após essa etapa, as BMDCs foram adicionadas à cultura, seguidas do *P.brasiliensis* e/ou agonistas de PRRs (conforme descrito anteriormente). A proporção final foi 1:10 (DC:esplenócitos) e as co-culturas foram incubadas em meio RPMI suplementado para indução de proliferação celular por 5 dias em estufa a 37°C, quando os sobrenadantes foram coletados para avaliação de citocinas representativas das subpopulações de Th: Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-13) e Th17 (IL-17A).

#### **4.8 - Determinação dos níveis de transcritos de IL-12p35**

RNA total de DCs foi extraído empregando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Tratamento com DNase durante a extração foi realizado a fim de assegurar que o produto final fosse livre de contaminação pelo DNA genômico. Após avaliação quantitativa e qualitativa do RNA, o mesmo foi transcrito de forma reversa para

cDNA usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems). Foi utilizado como molde 1 µg de RNA em reações de 20 µl contendo 2 µl de tampão da transcriptase reversa (10X), dNTPs 4 mM, iniciadores de sequências aleatórias e 50 U da enzima transcriptase reversa MultiScribe™. A reação de síntese do cDNA ocorreu sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos para desnaturação da enzima.

A quantificação do acúmulo diferencial de transcritos foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. Foi utilizado o método de detecção por SYBR® Green, um intercalante fluorescente de dupla fita de DNA. Os ensaios foram realizados em reações de 10 µl contendo 5 µl de solução completa para qPCR com SYBR® Green 2X (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada iniciador (tabela 1) e 2 µl da reação de síntese de cDNA. Como parâmetros dos ciclos de amplificação foram realizados uma etapa inicial a 95°C por 20 segundos para ativação da DNA polimerase e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Após os ciclos de amplificação foi realizada a análise da curva de dissociação (*melting curve*) dos produtos para verificação da especificidade da amplificação. A quantificação relativa foi calculada pelo método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et al., 2001). Esse método se baseia na comparação dos valores de Ct (ciclo de amplificação em que o sinal emitido atinge o limiar de detecção. *Threshold cycle*) entre as amostras dos grupos controle e experimental após normalização inicial pelo Ct de um gene constitutivo, onde  $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(grupo\ experimental)} - \Delta Ct_{(grupo\ controle)}]$  e  $[\Delta Ct = Ct_{(gene\ estudado)} - Ct_{(gene\ constitutivo)}]$ . Como controle constitutivo foi escolhido o gene Rps9, que codifica uma das proteínas componentes da subunidade ribossomal 40S.

**Tabela 1.** Iniciadores para genes murinos utilizados nos ensaios de RT-qPCR. S: senso; As: antisenso.

<b>Gene</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5' → 3')</b>
Rps9	S	CTATTCACCATGCCCGTGTG
	As	GAGAGTCCAGGCGAACAATG
Il-12a	S	GGCCATCAACGCAGCACTTC
	As	CACAGGAGGTTTCTGGCGCA

#### **4.9 - Citometria de Fluxo**

As células dendríticas infectadas e/ou tratadas com agonistas de PRR (conforme descrito anteriormente) por 24 horas foram avaliadas quanto a expressão de marcadores de maturação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (APC e FITC) específicos para as moléculas de superfície de interesse por 30 minutos: anti-CD11c, anti-CD80 e anti-CD86 (todos da Ebioscience) com as concentrações sugeridas pelo fabricante. O anticorpo anti-CD11c é associado ao fluoroforo APC, enquanto os demais são associados ao fluoroforo FITC. Como controle isotópico foram utilizados anticorpos do mesmo isótipo contra antígenos não relacionados conjugados aos respectivos fluorocromos. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) e ressuspensas em 300µl do mesmo tampão. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSVerse – BD Biosciences), utilizando-se o software FlowJo X (TreeStar software). Foram adquiridos no mínimo 50.000 eventos em cada uma das amostras.

#### **4.10 - Análise estatística**

Foi utilizada análise da variância (ANOVA) para determinar as diferenças entre os grupos experimentais, seguida pelo método pós-teste (Bonferroni t test). Testes e análises foram feitos pelo programa GraphPad Prisma versão 6.0 para Windows (San Diego, Califórnia, USA). Dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 - Resultados e Discussão

### 5.1 - Interação entre BMDCs, *P. brasiliensis* e agonistas de PRRs

Inicialmente foi avaliada a produção de citocinas por BMDCs infectadas com *Paracoccidioides brasiliensis* e/ou estimuladas com agonistas de PRRs por 24 horas (Figura 3). TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12p70 são citocinas pró-inflamatórias que estão associadas ao desenvolvimento de uma resposta adaptativa com predominância de linfócitos auxiliares Th1 e Th17, sendo assim, com perfil de resposta protetor ao hospedeiro contra essa infecção fúngica (CALICH *et al*, 2008; LANDMANN, WÜTRICH & HOHL, 2012). BMDCs infectadas com *P. brasiliensis* secretam IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em níveis significativamente maiores que as células não infectadas. A adição dos agonistas Pam3csk4 e Zymosan às células infectadas promoveu um aumento significativo da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Figura 3A, B e C) quando comparado ao grupo infectado não tratado. Contudo, o mesmo aumento de produção não foi observado quando Zymosan Depletado foi adicionado à cultura.

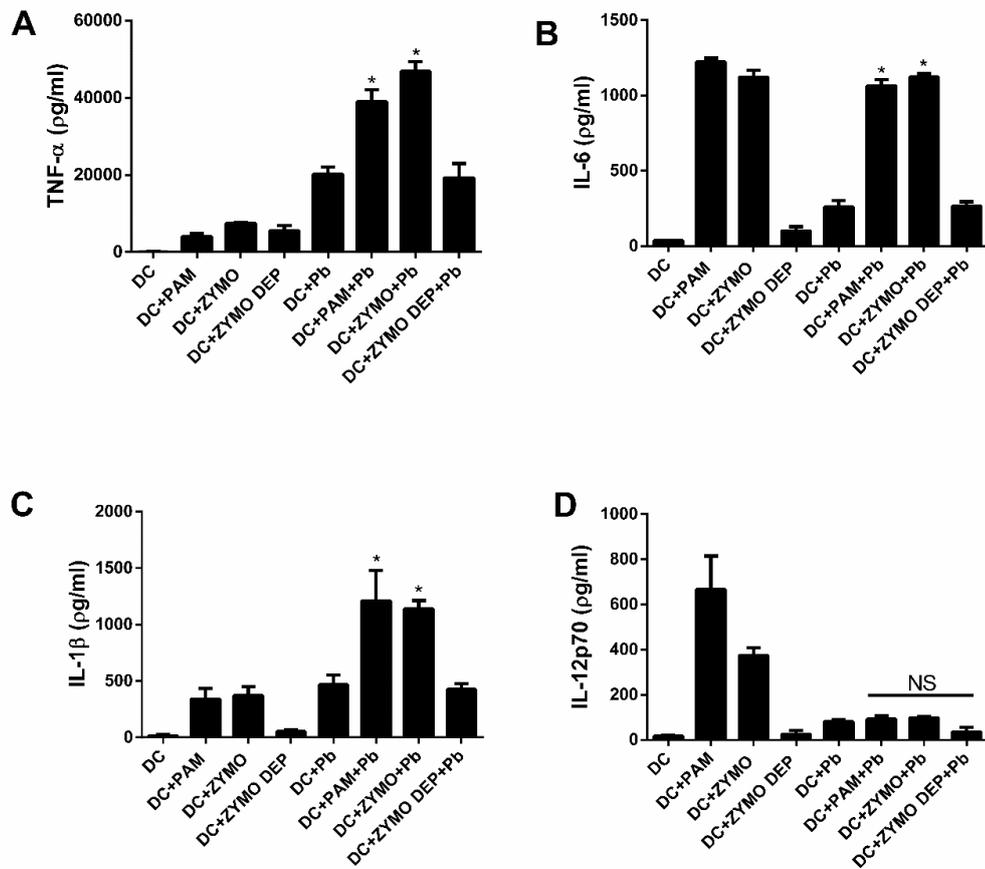
IL-1 $\beta$  é uma citocina que influencia diretamente a atividade microbicida frente à infecção com *P. brasiliensis*, controlando seu crescimento intracelular. A expressão de pró-IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  é estimulada pela sinalização de PRRs, como CLRs e TLRs, e depende da ativação da via canônica de NF $\kappa$ B. Além disso, a pró-IL1 $\beta$  necessita ser clivada para dar origem à sua forma bioativa, IL-1 $\beta$ . Isto ocorre devido à atividade do complexo inflamassoma NLRP3 (que são proteínas citoplasmáticas), dependente de caspase-1, uma enzima tirosina-quinase (TAVARES *et al*, 2013). TNF- $\alpha$  e IL-6 também são citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a proteção do hospedeiro. TNF- $\alpha$  é uma das primeiras citocinas a serem produzidas, desencadeando a resposta imune e é encontrada em alta quantidade em camundongos resistentes à infecção com *P. brasiliensis* (CALICH *et al*, 1998). Além disso, TNF- $\alpha$  é um importante indutor do processo de migração de DCs para os linfonodos (SAID & WEINDL, 2015). Por sua vez, IL-6 é muito importante para a manutenção da resposta adaptativa com predominância de linfócitos Th1. Camundongos que não expressam essa citocina têm maior produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória, relacionada com perfil de resposta Th2) e baixa atividade

de linfócitos Th1. Ainda foi observado que pacientes com candidíase vaginal recorrente têm baixa produção de IFN- $\gamma$  local, pois as células epiteliais da mucosa não produzem IL-6 (ROMANI, 2011). Assim, o tratamento com esses agonistas de PRRs se mostra interessante e benéfico para o hospedeiro de *P. brasiliensis*, por aumentar a produção de citocinas que auxiliam no desenvolvimento de uma resposta imune adequada.

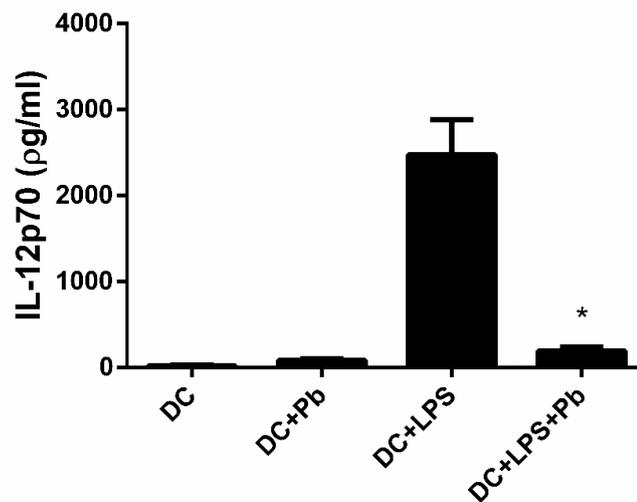
Interessantemente, IL-12p70 não foi produzida significativamente em nenhum grupo de células infectadas, nem mesmo na presença de Pam3csk4 e Zymosan, que são agonistas que aumentam a produção dessa citocina na ausência do fungo (Figura 3D). Fato que indica possível inibição exercida pelo *Paracoccidioides brasiliensis* sobre IL-12p70.

Essa citocina é de grande importância para o hospedeiro de *P. brasiliensis*, uma vez que ela é capaz de auxiliar na diminuição da disseminação da PCM humana e murina e contribuir para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa com linfócitos auxiliares (CD4+) do tipo Th1 (ARRUDA *et al*, 2002; CALICH *et al*, 2008; DE CASTRO *et al*, 2013). IL-12 também se faz importante por induzir a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T e células NK, sendo assim um fator essencial para a resistência contra infecções não apenas de caráter fúngico, mas também causadas por bactérias e protozoários intracelulares (TRINCHIERI, 2003; CASADEVALL, 2008).

Sendo assim, a avaliação do potencial inibitório exercido pelo *P. brasiliensis* na produção de IL-12 foi expandida utilizando-se BMDCs estimuladas com LPS para analisar o perfil de produção de IL-12p70 (Figura 4). Como esperado, LPS induziu a produção de altos níveis de IL12p70, porém na presença do fungo ocorre uma extensiva inibição nessa produção, confirmando o efeito inibitório exercido pelo *P. brasiliensis* em BMDCs.



**Figura 3.** Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (C) e IL-12p70 (D) do sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectados ou não com *P. brasiliensis* (Pb) e/ou tratados com os agonistas de PRRs PAM3CSK4 (PAM), Zymosan (Zymo) e Zymosan depletado (Zymo dep) por meio de ELISA. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DC+Pb. NS: não significativo em relação ao grupo DC+Pb. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.



**Figura 4.** *P. brasiliensis* inibe a produção de IL-12p70 induzida por LPS. A produção de IL-12p70 foi avaliada no sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectados com *P. brasiliensis* (Pb) e/ou tratados com LPS utilizando ELISA. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DC+LPS. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

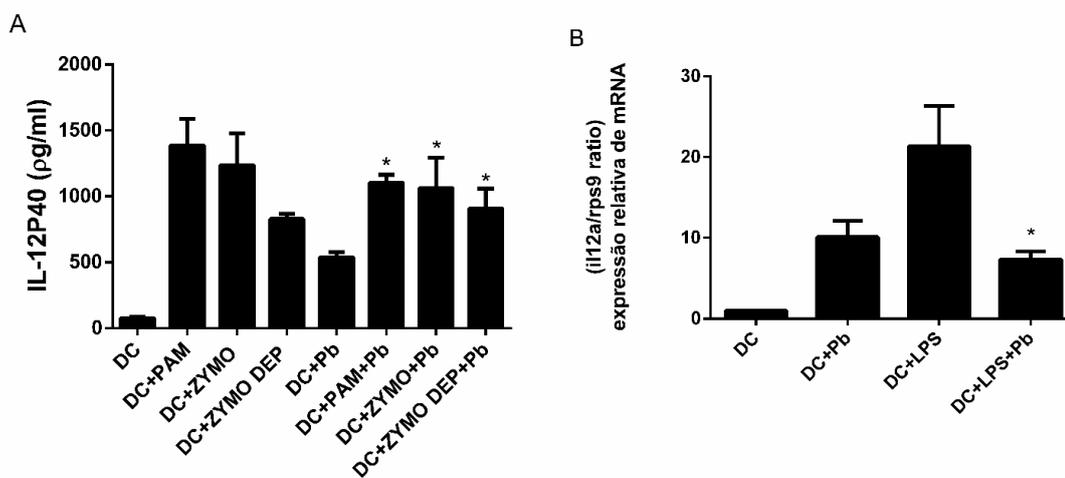
A redução da produção de IL-12p70 já foi mostrada anteriormente, mas não foi realizada análise estendida da via e de prováveis mecanismos usados pelo *P. brasiliensis* para inibir a citocina (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004).

## 5.2 - A inibição de IL-12p70 em BMDCs causada por *P. brasiliensis*

A citocina IL-12p70 é constituída por duas subunidades diferentes: p35 (35 kDa) e p40 (40 kDa), expressas em cromossomos diferentes. Juntas, essas subunidades formam a IL-12 bioativa, com 70 kDa. Enquanto a subunidade p40 é comum a IL-12 e IL-23 (ambas pertencentes à família IL-12), p35 é exclusiva de IL-12 e secretada apenas na presença de p40 (GLUBER *et al*, 1991; WOLF *et al*, 1991; HAMZA, BARNETT & LI, 2010).

Nesse contexto, a fim de avaliar qual subunidade seria inibida pelo fungo, realizou-se a dosagem de IL-12p40 por ELISA e viu-se que nas células infectadas pelo *P. brasiliensis* as BMDCs são capazes de produzir essa subunidade, sendo a produção inclusive maior em resposta aos 3 agonistas utilizados (Figura 5A). Diante

desse resultado e considerando o fato de não ocorrer disponibilidade comercial de ELISA específico para a subunidade p35 da IL-12, avaliou-se os níveis de transcritos de IL-12A (gene que codifica a subunidade p35 da IL-12) por PCR quantitativo em tempo real em BMDCs estimuladas com LPS e infectadas ou não com *P. brasiliensis*. Viu-se que os níveis dos transcritos de IL-12A foram drasticamente reduzidos na presença do fungo, indicando que a inibição causada por *P. brasiliensis* ocorre na subunidade p35, exclusiva da IL-12 (Figura 5B).

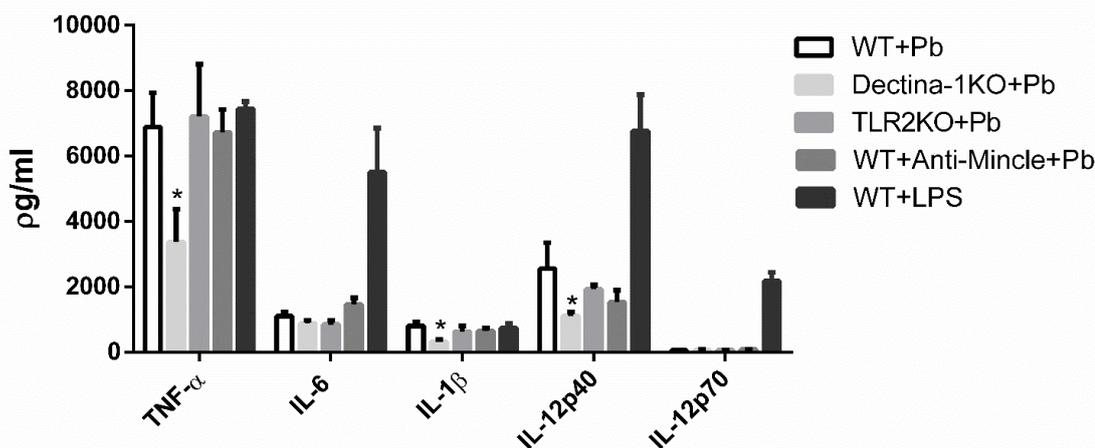


**Figura 5.** *P. brasiliensis* inibe a subunidade p35 e não p40 de IL-12 em BMDCs. (A) Quantificação de IL12p40 no sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectados ou não com *P. brasiliensis* (Pb) e/ou tratados com os agonistas de PRRs PAM3CSK4 (PAM), Zymosan (Zymo) e Zymosan depletado (Zymo dep) por meio de ELISA. (B) Expressão relativa de transcritos il12a (IL12p35) em DC infectados com Pb e/ou tratados com LPS por RT-PCR. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DC+Pb (A) e DC+LPS (B). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

A inibição de IL-12 em DCs humanas foi descrita para várias espécies de fungos patogênicos do gênero *Fonsecaea*, incluindo *F. pedrosoi*, um dos principais agentes etiológicos da cromoblastomicose. A inibição ocorre sobre a subunidade p35 e o mecanismo é conhecido: o fungo se liga ao receptor PRR Mincle, ativando vias de sinalização que levam a perda da atividade nuclear de IRF1 (*interferon regulatory factor 1*), com consequente bloqueio da transcrição de IL12A (WEVERS *et al.*, 2014).

Considerando a inibição exercida por *F. pedrosoi*, foi investigada a possibilidade de Mincle também atuar no contexto da inibição causada por *P. brasiliensis*. Então, utilizou-se anticorpo anti-mincle para bloquear a ação do receptor e avaliar se assim a inibição de IL-12 seria revertida. Além disso, outros receptores PRRs foram testados para avaliar se estão envolvidos nesse mecanismo inibitório. Para fazer essa análise foram utilizadas BMDCs KO para Dectina-1 e para TLR-2, que são envolvidos no reconhecimento do fungo (LOURES *et al*, 2009; LOURES *et al*, 2014; FERRIOTTI *et al.*, 2015)

Mesmo com o bloqueio do receptor Mincle e a deficiência dos receptores Dectina-1 e TLR-2, não ocorreu reversão da inibição exercida pelo fungo em BMDCs, uma vez que a produção de IL-12p70 ainda permanece inibida (Figura 6). Assim, nenhum dos receptores avaliados parece participar do mecanismo de inibição da produção de IL-12 pelo *P. brasiliensis*. Entretanto, é possível observar a importância de Dectina-1 para a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12p40, uma vez que a produção dessas citocinas é reduzida na ausência do receptor. Esse resultado corrobora estudos recentes que apontam um papel protetor exercido pela sinalização do receptor Dectina-1 na PCM experimental (LOURES *et al.*, 2014; FERRIOTTI *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Nível das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12 p40 e IL12p70 no sobrenadante de culturas de BMDCs WT (tipo selvagem), dectin-1ko (deficiente para dectina-1), TLR2KO (deficiente para TLR2) ou WT+Anti-mincle (tipo selvagem tratadas com anticorpos bloqueadores anti-mincle) infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) e WT+LPS (tipo selvagem tratadas com LPS). \* indica diferença

significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo WT+Pb. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

### 5.3- Agonistas de PRRs estimulam a maturação de BMDCs

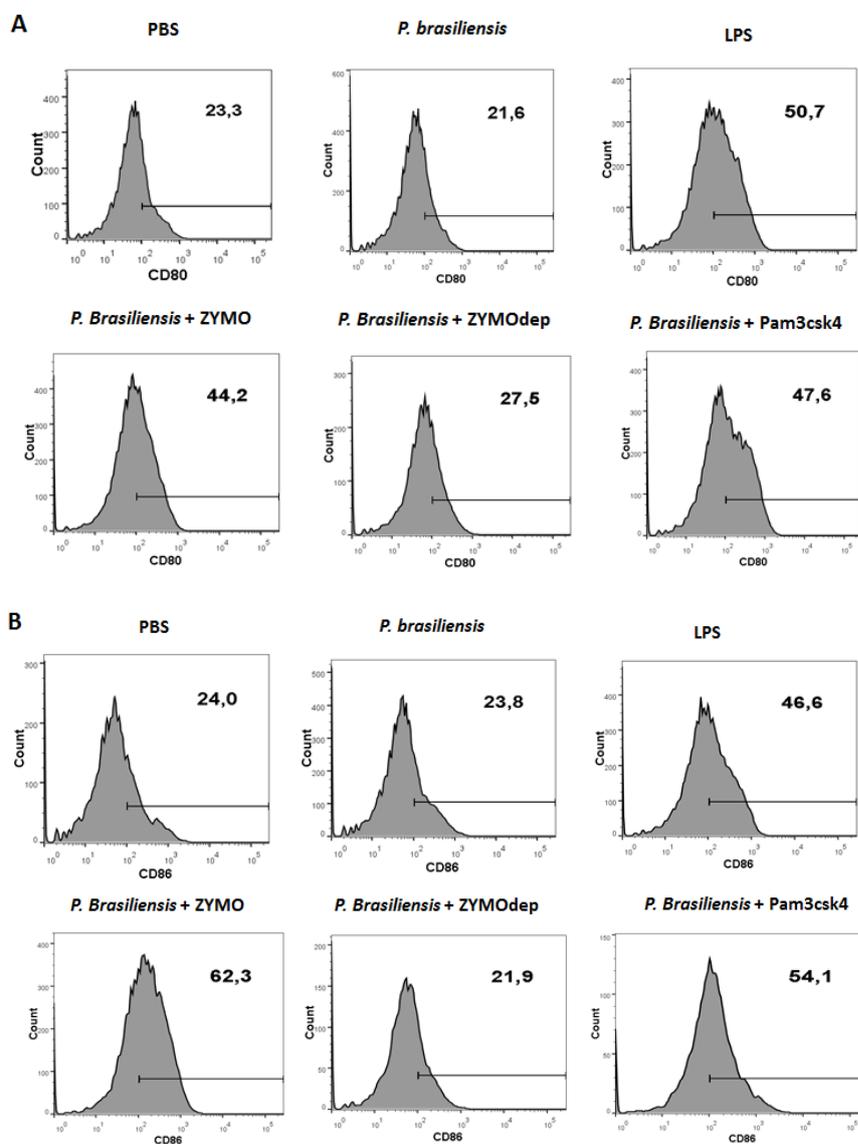
Como dito anteriormente, um dos processos imprescindíveis para que as DCs realizem a apresentação de antígenos de forma adequada aos linfócitos é a sua maturação. Quando seus PRRs são ativados e dão início às suas respectivas vias de sinalização, alguns receptores de superfície passam a ser mais expressos, como é o caso das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, que associadas à apresentação de antígenos via moléculas de MHC, são essenciais para a ativação de linfócitos T virgens (BANCHEREAU *et al*, 2000; WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

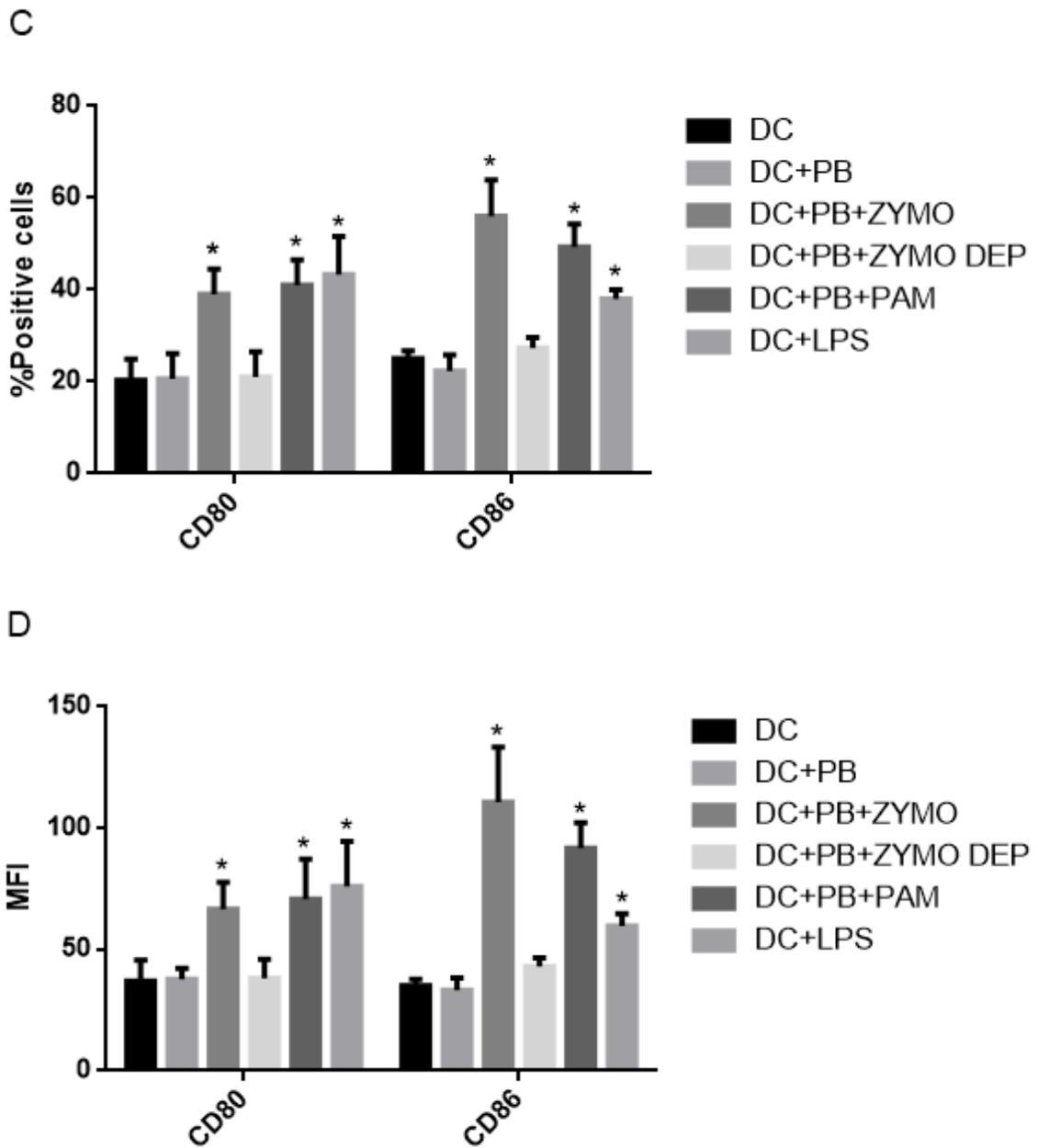
Nesse contexto, foi realizada uma análise em citômetro de fluxo para elucidar a capacidade dos agonistas de PRRs de modularem o processo de maturação das DCs (Figura 7). É possível observar que a expressão de ambas as moléculas, CD80 e CD86, é aumentada quando Zymosan e Pam3csk4 são adicionados às BMDCs infectadas com *P. brasiliensis*. Este fato ocorre tanto em relação à porcentagem de células da cultura que expressam essas moléculas coestimulatórias (Figura 7B), como em relação à quantidade que essas BMDCs passam a expressar tais moléculas (Figura 7C).

A cronicidade da PCM pode se dar devido à capacidade do fungo de evadir-se do reconhecimento pelos PRRs e impedir em DCs o aumento da expressão de MHC de classe II e das moléculas coestimulatórias CD54, CD80 e CD86, mesmo na presença de LPS, considerado um potente indutor da maturação dessas células (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004), diminuindo a apresentação antigênica a linfócitos T virgens. Tal fato pode ser considerado uma característica de evasão deste fungo, pois se sabe que ele também é capaz de reduzir a expressão de MHC de classe II em macrófagos (BOCCA *et al*, 1999). Sendo assim, novamente observa-se que o tratamento com os agonistas de PRRs é benéfico e promove o desenvolvimento de uma resposta imune adequada, pois consegue reverter a

redução da expressão de receptores de superfície causada pelo *P. brasiliensis* em BMDCs.

Diversos fatores são importantes para determinar a resistência ou a susceptibilidade ao *P. brasiliensis*. Dentre eles, a quantidade de células apresentadoras de antígeno e a expressão de moléculas de superfície relacionadas a essa apresentação, pois isso é fator determinante para iniciar diferentes perfis de resposta adaptativa (THIND, TABORDA & NOSANCHUK, 2015). Logo, o tratamento com os agonistas de PRRs não se limita simplesmente ao fato de aumentar a expressão de moléculas coestimulatórias. Mas pode significar um potencial para modular direcionar os tipos de linfócitos T desenvolvidos durante a infecção.



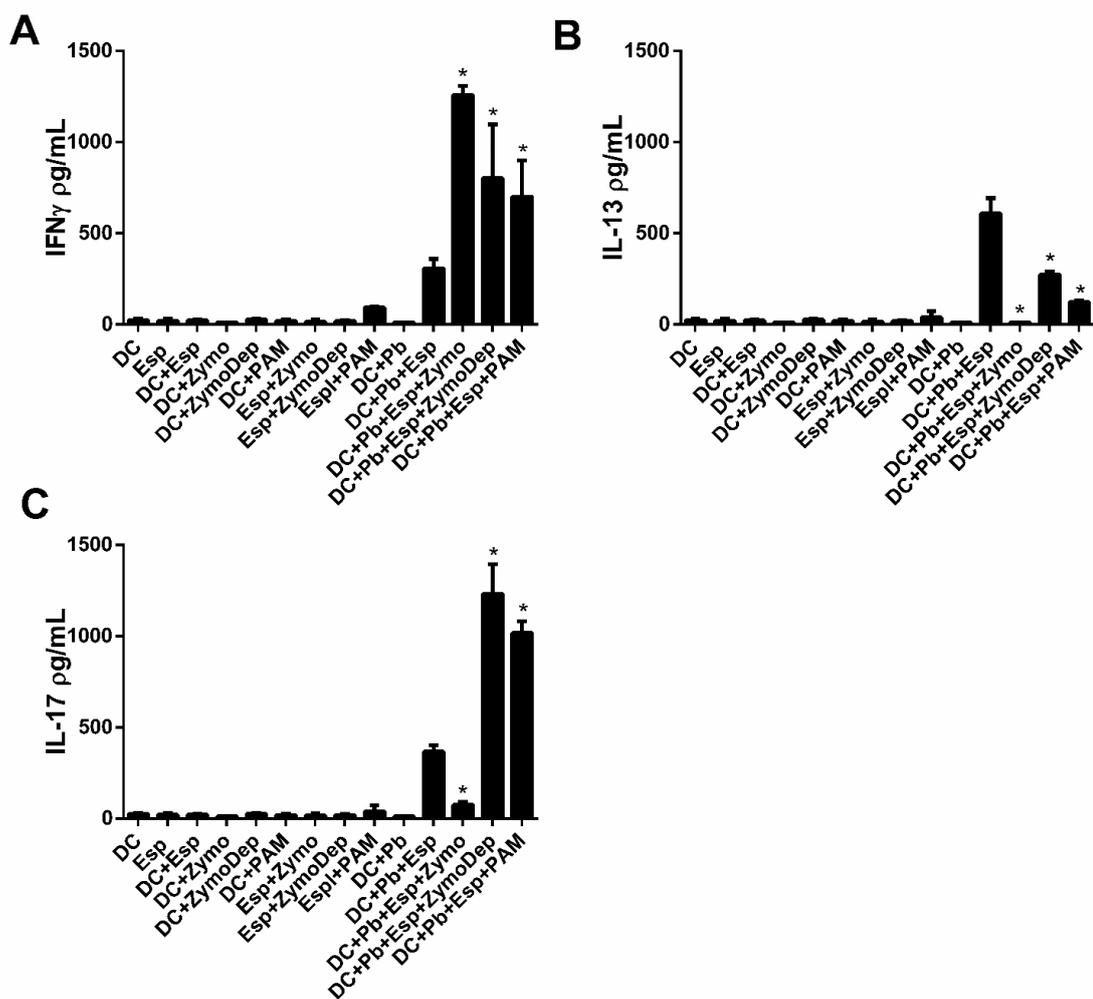


**Figura 7:** Histogramas representativos da análise de expressão dos marcadores de maturação CD80 (A) e CD86 (B) de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (PB) tratadas ou não com agonistas de PRRs PAM3CSK4 (PAM), Zymosan (Zymo) e Zymosan depletado (Zymo dep) por meio de citometria de fluxo. (C) Porcentagem de células expressando (positivas) os marcadores e a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão desses marcadores (D). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DC+Pb. Os dados (C e D) são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata.

#### **5.4 - A influência dos agonistas de PRRs no perfil de resposta imune adaptativa**

O principal papel de DCs é o processamento de microrganismos para apresentação de antígenos à linfócitos T auxiliares virgens, iniciando assim a resposta imune adaptativa. Nesse contexto a natureza da interação entre a própria DC e o microrganismo e as citocinas e moléculas coestimulatórias produzidas, direcionam o tipo predominante de linfócitos auxiliares (Th). A produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  caracteriza um perfil de resposta com predominância de linfócitos Th1, enquanto as citocinas IL-4, IL-13 e TGF- $\beta$  caracterizam uma resposta adaptativa com predominância de linfócitos Th2 (BANCHEREAU *et al*, 2000; TRINCHIERI, 2003; CALICH *et al*, 2008).

Na paracoccidiodomicose, o desenvolvimento de um perfil Th1 é essencial, pois é considerado como protetor e está relacionado com a resistência a essa infecção. Por outro lado, as formas aguda e crônica da doença, bem como a disseminação do fungo, estão associadas ao desenvolvimento do perfil Th2 de linfócitos auxiliares, que é considerado o perfil susceptível (ARRUDA *et al*, 2002; CALICH *et al*, 2008; DE CASTRO *et al*, 2013). Para o direcionamento de um ou outro perfil de resposta imune adaptativa os PRRs e seus ligantes fúngicos, conhecidos como PAMPs, são de extrema importância, pois são eles que irão induzir a produção de citocinas características dos diferentes perfis de linfócitos auxiliares (WÜTHRICH, DEEPE & KLEIN, 2012). Assim, neste trabalho foi avaliado de que forma os agonistas de PRRs estudados alterariam o perfil das subpopulações de linfócitos T auxiliares (Figura 8). BMDCs infectadas com *P. brasiliensis* e tratadas ou não com os agonistas de PRRs foram cocultivadas com esplenócitos totais enriquecidos para linfócitos T e o sobrenadante dessa cultura avaliado quanto a produção de citocinas características das populações de linfócitos Th1 (IFN $\gamma$ ), Th2 (IL-13) e Th17 (IL-17).



**Figura 8.** Quantificação de IFN- $\gamma$  (A), IL-13 (B) e IL-17 (C) no sobrenadante de co-culturas de BMDC infectadas por *P. brasiliensis* e esplenócitos tratadas com agonistas de PRRs. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DC+Pb+Esp. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata. DC: célula dendrítica; Esp: esplenócitos; Zymo: zymosan; Zymodep: zymosan depletado; PAM: Pam3csk4.

A quantificação de citocinas do sobrenadante de BMDCs infectadas por *P. brasiliensis* e cocultivadas com esplenócitos mostra que o fungo induz uma ativação mista de subpopulações de linfócitos T auxiliares, com predominância do perfil Th2 (IL-13). De fato, as DCs infectadas com *P. brasiliensis* possuem baixa capacidade de induzir uma ativação eficaz Th1 *in vivo* (DOS SANTOS *et al*, 2011), confirmando estudos prévios que mostram que o fungo inibe a expressão de moléculas MHC classe II e de IL12p70, a principal citocina indutora da diferenciação de linfócitos T

virgens para a população Th1, por DCs (como mostrado no presente trabalho) (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004).

O tratamento com os agonistas proporcionou uma mudança do perfil de linfócitos T auxiliares, pois induziu um aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos e ao mesmo tempo reduziu significativamente a secreção da citocina característica de populações Th2, IL-13. Dessa maneira, o tratamento de DCs com agonistas de PRRs Zymosan, Zymosan Depletado e Pam3csk4 induz uma resposta com potencial protetor (Th1), sugerindo que esse tratamento poderia beneficiar o hospedeiro em infecções *in vivo*. É importante notar que os grupos controles contendo apenas DCs ou esplenócitos ou ainda estas células infectadas e/ou tratadas com os agonistas não apresentaram em seus sobrenadantes concentrações significativas das citocinas características das subpopulações de linfócitos T, pois não há a interação entre DC e linfócitos.

Considerando que o fungo inibe a produção de IL-12p70 em BMDCs, via inibição da expressão de IL12A (IL-12p35), e que essa citocina é a principal que induz a diferenciação de linfócitos Th1, será dosado no sobrenadante das coculturas com esplenócitos outras citocinas associadas à indução da diferenciação para essa subpopulação como, IL-18 e IL-27, a fim de elucidar de que forma os agonistas induzem uma maior produção de IFN- $\gamma$ , a citocina característica da subpopulação Th1. Essas citocinas também podem estar relacionadas com a indução da produção de IFN- $\gamma$  por células NK por linfócitos. IL-18 é capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T, além da proliferação dessas células, de forma independente de IL-12, sendo mais uma citocina regulatória da diferenciação de linfócitos (OKAMURA *et al*, 1995). E além de IL-12 e IL-18 desenvolverem atividades semelhantes, sinergicamente, mas de forma independente uma da outra, suas vias de regulação de transcrição também diferem (KOHNO *et al*, 1997; YANG *et al*, 2001), o que indica que o mesmo fator inibitório de uma delas, pode não agir sobre a outra. Já IL-27, por sua vez, atua inibindo GATA3, um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento de linfócitos Th2, que inibe a produção de linfócitos Th1. Além disso, estimula T-bet, um fator de transcrição imprescindível para o desenvolvimento de linfócitos com perfil Th1. Apesar de sozinha não produzir IFN- $\gamma$  tão bem quanto

IL-18, e necessitar de IL-12 para isso, IL-27 também merece ser avaliada, pois influencia nesses fatores de transcrição e age mediando a responsividade dos linfócitos a IL-12 (LUCAS *et al*, 2002; PFLANZ *et al*, 2002; TAKEDA *et al*, 2003).

Na PCM murina, sabe-se que IFN- $\gamma$  tem a habilidade de regular a produção de quimiocinas e seus receptores, além de modular os tipos celulares presentes no infiltrado celular nos pulmões. Camundongos KO para IFN- $\gamma$  têm uma pequena quantidade de macrófagos nos pulmões, além de menor presença de linfócitos T, quando comparado ao grupo WT. Quimiocinas importantes para a formação de granulomas, como CCR2, CCR5 e CXCR3, também são menos expressas nos camundongos KO para IFN- $\gamma$  (SOUTO *et al*, 2003). A importância de IFN- $\gamma$  também já foi demonstrada para a formação adequada de granulomas, que são estruturas geradas para conter o crescimento do fungo e evitar sua disseminação, compostas por células epiteliais, macrófagos e neutrófilos. Na ausência de IFN- $\gamma$ , o granuloma formado tem poucas células, é frouxo e há grande número de leveduras. (CANO *et al*, 1998; SOUTO *et al*, 2000). Essa citocina ainda é importante para o aumento da produção de NO, para a ativação de macrófagos, que são as principais células efetoras da imunidade celular, levando-os a ter uma melhor atividade microbicida e para induzir a produção de imunoglobulinas IgG2a e IgG3, que atuam na fixação do sistema complemento e na opsonização do fungo (CANO *et al*, 1995). Em estudo realizado com células de humanas infectados com *P. brasiliensis*, também já foi mostrado que pacientes assintomáticos apresentam os níveis mais altos de IFN- $\gamma$  (tanto os níveis do transcrito do gene da citocina, quanto sua dosagem na cultura por ELISA são maiores) do que aqueles com as formas crônica e aguda da doença, que têm altos níveis de IL-4, relacionada com linfócitos Th2 (principalmente aqueles com a forma aguda da PCM) (DE CASTRO *et al*, 2013). Tal fato, mais uma vez relacionada a importância de IFN- $\gamma$  com a resistência à infecção.

O aumento da produção de IFN- $\gamma$  visto nesse trabalho representa o melhor desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa com perfil de linfócitos Th1, pois são eles que produzem essa citocina. Levando em conta todas as funções citadas de IFN- $\gamma$  na PCM, mais uma vez o tratamento com os agonistas de PRRs se mostra

importante e protetor, sugerindo que pode ser útil para o hospedeiro desenvolver uma melhor resistência à essa micose sistêmica.

## 6 - Conclusão

Com a realização do presente trabalho é possível constatar que o uso de agonistas de PRRs na infecção de BMDCs *in vitro* com *P. brasiliensis* se mostra potencialmente útil, pois em diversos aspectos melhora as atividades da principal célula associada a indução da resposta imunológica adaptativa.

Foi visto que Zymosan e Pam3csk4 são capazes de induzir o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que participam de processos importantes nessa infecção fúngica. Também foi observado o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias CD 80 e CD 86 em BMDCs infectadas. Tal fato é interessante, pois já foi mostrado anteriormente que o *P. brasiliensis* inibe a maturação de tais células (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004). Os agonistas ainda se mostram interessantes pela sua capacidade de modular o perfil de imunidade adaptativa gerado, reduzindo a produção das citocinas características do perfil de linfócitos Th2, IL-13, e aumentando a produção daquelas citocinas relacionadas com linfócitos Th1 e Th17, IFN- $\gamma$  e IL-17, respectivamente.

Ainda foi observada a capacidade do *P. brasiliensis* de inibir a citocina IL-12p70 e foi mostrada que tal inibição ocorre na transcrição da subunidade p35 da citocina. Apesar de não se saber o mecanismo pelo qual o fungo realiza a inibição, foi mostrado também que não é via receptores Mincle, Dectina-1 e TLR-2.

Ainda há algumas questões não respondidas em relação ao presente estudo. Por exemplo, uma vez que IL-12 está inibida, qual é a citocina produzida com o estímulo dos agonistas para induzir a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos? E ainda, qual é o mecanismo pelo qual o fungo é capaz de inibir a transcrição de IL-12p35? Para o melhor entendimento desses pontos é necessário avaliar a presença de outras citocinas que poderiam ter induzido a produção de IFN- $\gamma$ , e também é necessária a continuidade da investigação de possíveis receptores ou moléculas que estariam associadas a inibição de IL-12. Além disso, é necessária a avaliação *in vivo* da imunomodulação dos agonistas de PRRs no modelo experimental de PCM

murina. Duas abordagens são possíveis: (i) tratamento intranasal dos agonistas em camundongos infectados com *P. brasiliensis*; (ii) tratamendo *in vitro* de BMDCs com os agonistas e administração dessas células via intratraqueal em camundongos infectados. Vale ressaltar que concomitante a esse trabalho foi desenvolvido análise da imunomodulação dos mesmos agonistas em macrófagos, com resultados promissores em relação a indução da capacidade fungicida dessas células. Nesse contexto, observou-se que o tratamento proporcionou o aumento da principal molécula microbicida (NO) e a maior capacidade de acidificação do fagolisossomo.

## 7 – Referências Bibliográficas

ARRUDA, Celina et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clinical Immunology**, v. 103, n. 2, p. 185-195, 2002.

AZEVEDO, E. Silva et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 341-344, 2008.

BANCHEREAU, Jacques et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BOCCA, Anamelia L. et al. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 2, p. 280-287, 1999.

BORGES-WALMSLEY, M. Ines et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 5, p. 585, 1985.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CALICH, Vera Lúcia Garcia et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-236, 2008.

CANO, Luz E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation,

cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CANO, Luz E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CASADEVALL, Arturo. Evolution of intracellular pathogens. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 19-33, 2008.

COLOMBO, Arnaldo Lopes et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical mycology**, v. 49, n. 8, p. 785-798, 2011.

COUTINHO, Ziadir Francisco et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

DENNEHY, Kevin M. et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. **European journal of immunology**, v. 38, n. 2, p. 500-506, 2008.

DENNEHY, Kevin M. et al. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. **European journal of immunology**, v. 39, n. 5, p. 1379-1386, 2009.

DA GLÓRIA SOUSA, Maria et al. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 5, p. 436-443, 2011.

DA SILVA, Silvana Petrofeza et al. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1039-1050, 1999.

DE CASTRO, Livia Furquim et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470-485, 2013.

DE OLIVEIRA, Haroldo C. et al. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

DOS SANTOS, Suelen Silvana; FERREIRA, Karen Spadari; ALMEIDA, Sandro Rogerio. Paracoccidioides brasiliensis-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19690, 2011.

ERWIG, Lars P.; GOW, Neil AR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163-176, 2016.

FERIOTTI, Claudia et al. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

FERREIRA, Karen Spadari; LOPES, José Daniel; ALMEIDA, Sandro Rogério. Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis. **Immunology letters**, v. 94, n. 1, p. 107-114, 2004.

FERWERDA, Bart et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1760-1767, 2009.

GRAHAM, Lisa M. et al. The C-type lectin receptor CLECSF8 (CLEC4D) is expressed by myeloid cells and triggers cellular activation through Syk kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 31, p. 25964-25974, 2012.

GUBLER, Ueli et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 10, p. 4143-4147, 1991.

GLOCKER, Erik-Oliver et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1727-1735, 2009.

HAMZA, Therwa; BARNETT, John B.; LI, Bingyun. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 3, p. 789-806, 2010.

HARDISON, Sarah E.; BROWN, Gordon D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nature immunology**, v. 13, n. 9, p. 817-822, 2012.

KASHINO, Suely Sanae et al. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, n. 3, p. 173-178, 1985.

KERSCHER, Bernhard et al. Mycobacterial receptor, Clec4d (CLECSF8, MCL), is coregulated with Mincle and upregulated on mouse myeloid cells following microbial challenge. **European journal of immunology**, v. 46, n. 2, p. 381-389, 2016.

KOHNO, Keizo et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 4, p. 1541-1550, 1997.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen recognition by the innate immune system. **International reviews of immunology**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé; WÜTHRICH, Marcel; HOHL, Tobias M. Immunity to fungi. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 4, p. 449-458, 2012.

LEMOINE, Sébastien et al. Dectin-1 activation unlocks IL12A expression and reveals the T H 1 potency of neonatal dendritic cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 5, p. 1355-1368. e15, 2015.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOURES, Flávio V. et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1279-1290, 2009.

LOURES, Flávio V. et al. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+ IL-17+ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 762-773, 2014.

LUCAS, Sophie et al. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15047-15052, 2003

LUTZ, Manfred B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

MAGALHÃES, A. et al. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 23-29, 2012.

MCGREAL, Eamon P. et al. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. **Glycobiology**, v. 16, n. 5, p. 422-430, 2006.

MEIRA, Domingos Alves et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 5, p. 496-503, 1996.

OKAMURA, Haruki et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 88-91, 1995.

PAGLIARI, Carla et al. Revisiting Langerhans cells in paracoccidioidomycosis: expression of CD207/langerin in human cutaneous and mucosal lesions. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1012-1017, 2011.

PFLANZ, Stefan et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 779-790, 2002.

PUCCIA, Rosana et al. The Paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 257, 2011.

ROBINSON, Matthew J. et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 9, p. 2037-2051, 2009.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 11-24, 2004.

SAID, André; WEINDL, Günther. Regulation of dendritic cell function in inflammation. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

SAIJO, Shinobu et al. Dectin-2 recognition of  $\alpha$ -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 681-691, 2010.

SATO, Kota et al. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor  $\gamma$  chain to induce innate immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38854-38866, 2006.

SIEBURTH, D. et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 59-62, 1992.

SOUTO, Janeusa T. et al. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000.

SOUTO, Janeusa T. et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- $\gamma$ . **The American journal of pathology**, v. 163, n. 2, p. 583-590, 2003.

TAKEDA, Atsunobu et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 4886-4890, 2003.

TAVARES, Aldo Henrique. et al. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1459, 2012.

TAVARES, Aldo Henrique et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2595, 2013.

TAVARES, Aldo Henrique; BÜRCEL, Pedro Henrique; BOCCA, Anamélia Lorenzetti. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.

TAYLOR, Philip R. et al. Dectin-1 is required for  $\beta$ -glucan recognition and control of fungal infection. **Nature immunology**, v. 8, n. 1, p. 31-38, 2007.

THIND, Sharanjeet K.; TABORDA, Carlos P.; NOSANCHUK, Joshua D. Dendritic cell interactions with Histoplasma and Paracoccidioides. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424-432, 2015.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

WANKE, Bodo; AIDÉ, Miguel Abidon. Capítulo 6-Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, 2009.

WEVERS, Brigitte A. et al. Fungal engagement of the C-type lectin mInCLE suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 4, p. 494-505, 2014.

WOLF, STANLEY F. et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 9, p. 3074-3081, 1991.

WÜTHRICH, Marcel; DEEPE JR, George S.; KLEIN, Bruce. Adaptive immunity to fungi. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 115, 2012.

YANG, Jianfei et al. IL-18–stimulated GADD45 $\beta$  required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN- $\gamma$  production. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 157-164, 2001.

ZHU, Le-Le et al. C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 324-334, 2013.



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de outubro de 2014.



**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "USO TERAPÊUTICO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO NA PARACOCCIDIODIDOMICOSE MURINA.", UnBDoC n.º 117971/2014, sob responsabilidade do Professor Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior  
Coordenador da CEUA

Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.