



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

DAWANNE APARECIDA SILVA

**USO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES
NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS
POR *Paracoccidioides brasiliensis***

BRASÍLIA, 2018.

DAWANNE APARECIDA SILVA

**USO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES
NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS
POR *Paracoccidioides brasiliensis***

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Henrique F. P. Tavares

BRASÍLIA, 2018.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

ASI586u Aparecida Silva, Dawanne
USO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE
PADRÕES NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS
INFECTADOS POR *Paracoccidioides brasiliensis* / Dawanne
Aparecida Silva; orientador Aldo Henrique Fonseca Pacheco
Tavares. -- Brasília, 2018.
42 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. Macrófagos. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3.
Citocinas. 4. Agonistas. 5. Modulação do sistema imunológico.
I. Fonseca Pacheco Tavares, Aldo Henrique, orient. II.
Título.

DAWANNE APARECIDA SILVA

**USO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES
NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS
POR *Paracoccidioides brasiliensis***

BANCA EXAMINADORA

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

Profª Drª Jamila Reis de Oliveira
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Stephan Alberto Machado de Oliveira
(Faculdade Icesp)

Brasília, 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os portadores de paracoccidioidomicose que lutam diariamente em busca de cura e qualidade de vida, que os resultados desse estudo possam contribuir de alguma forma para seus tratamentos.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos à minha mãe, Marli, que sempre batalhou para me educar e acreditou em mim, à minha avó Carmelita que sempre me amou e me cuidou, à minha tia Sirlene que por várias vezes me cedeu o aconchego do seu lar para que eu pudesse dormir mais alguns minutos pela manhã antes de ir ao laboratório, bem como a todos os meus familiares que me apoiaram e me motivaram.

Ao meu orientador, Aldo Henrique Tavares, que tem toda minha admiração e é o cientista mais legal que eu conheço, por todo incentivo e paciência para me ensinar cada detalhe da nossa pesquisa. Agradeço com muito carinho a Gabriela Spolti por toda parceria durante os nossos anos de Pibic e que foi essencial na execução desse trabalho. Ao Pedro H. Burgel que com todo seu bom humor fazia os dias no lab. serem mais divertidos, à Mariana Damas que sempre foi um amor e exemplo de dedicação, ao Raffael de Castro por toda disposição em tirar as minhas dúvidas e a toda equipe do LIA da qual eu me orgulho em ter feito parte.

Agradeço também aos meus amigos Fernando Ricardo, Bruna Lepesqueur, Bábilla, Renato, Max, Sayuri e Nayra, que foram meu porto seguro durante as vezes em que a vontade de desistir aparecia e deles vinha a força para continuar. Ao Pedro Henrique, meu namorado por todo apoio e companheirismo.

Por fim, agradeço a todos aqueles que em algum momento tiveram presentes em alguma etapa dessa jornada e que colaboraram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.” (Marie Curie)

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico causador da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica em humanos com alta incidência na América Latina. A infecção se dá pela inalação de propágulos do fungo presentes no solo. A expressão de citocinas em infecções fúngicas é essencial na defesa de hospedeiros, para isso os agonistas agem sobre os receptores de membrana e trabalham sinergisticamente no reconhecimento de microrganismos e conseqüentemente na ativação de respostas celulares como a função microbicida de macrófagos. Estas são células fundamentais na reposta imune inata do hospedeiro, cujo principal papel é a fagocitose de patógenos. O objetivo do presente trabalho é avaliar a capacidade de ativação de fagócitos quando em interação com os agonistas PAM3CSK4 (agonista para TLR-2/TLR-1), Zymozan (agonista para dectina-1 e TLR2) e Zymozan Depletado (agonista para dectina-1). Macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos susceptíveis à infecção foram desafiados, *in vitro*, com leveduras de *P. brasiliensis*, e analisado o perfil de secreção de citocinas e produção de óxido nítrico. As células tratadas com os agonistas induziram maior produção das citocinas IL-1 β , IL-12p70 e TNF- α , respectivamente. Em ensaio de unidade formadora de colônia, ambos os estimuladores deram resultados significativos no aumento da ação fungicida dos macrófagos, embora o fungo tenha induzido maior secreção de óxido nítrico (NO) quando num co-estímulo do fagócito com LPS e IFN- γ . Entretanto, quando inibida a acidificação do fagolisossomo com Bafilomicina ou inibição da produção de NO com Aminoguanidina, viu-se redução na atividade microbicida da célula tratada com Zymozan e Zymozan Dep., sugerindo a importância do processo de acidificação e da produção de óxido nítrico na atividade fungicida de macrófagos tratados.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; macrófagos, agonistas de PRRs, citocinas, atividade fungicida.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a thermodynamorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), systemic mycosis in humans with high incidence in Latin America. The infection occurs by inhalation of fungus propagules present in the soil. The expression of cytokines in fungal infections is essential in the defense of hosts, for which the agonists act on the membrane receptors and work synergistically in the recognition of microorganisms and consequently in the activation of cellular responses as the microbicidal function of macrophages. These are fundamental cells in innate immune response of the host, whose main role is phagocytosis of pathogens. The aim of the present study is to evaluate the phagocyte activation capacity when interacting with the agonists PAM3CSK4 (agonist for TLR-2 / TLR-1), Zymozan (agonist for dectin-1 and TLR2) and Zymozan Depleted 1). Differentiated macrophages from the bone marrow of mice susceptible to infection were challenged in vitro with yeasts of *P. brasiliensis*, and the cytokine secretion profile and nitric oxide production were analyzed. Cells treated with the agonists induced higher production of IL-1 β , IL-12p70 and TNF- α cytokines, respectively. In the colony-forming unit assay, both stimulators gave significant results in enhancing the fungicidal action of macrophages, although the fungus induced higher secretion of nitric oxide (NO) when in a coagulation of the phagocyte with LPS and IFN- γ . However, when acidification of phagolysosome with Bafilomycin or inhibition of NO production with Aminoguanidine was inhibited, there was a reduction in the microbicidal activity of the cell treated with Zymozan and Zymozan Dep., Suggesting the importance of the acidification process and the production of nitric oxide in the fungicidal activity of treated macrophages.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; macrophages, PRR agonists, cytokines, fungicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Propagação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

Figura 2. O reconhecimento de PAMPs fúngicos através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR).

Figura 3. Dosagem das citocinas TNF- α (A), IL12p70 (B) e IL-1 β (C) do sobrenadante de cultura de BMDM (MO) infectados ou não com *P. brasiliensis* (Pb) e/ou tratados com os agonistas de PRRs.

Figura 4. Atividade fungicida de macrófagos (MO) murinos tratados com agonistas de PRRs frente ao *P. brasiliensis* (A) e produção de óxido nítrico (na forma de nitrito) (B).

Figura 5. Avaliação do efeito fungicida e produção de óxido nítrico após o tratamento com agonista de PRRs em macrófagos tratados ou não com Bafilomicina e Aminoguanidina.

LISTA DE ABREVIações

BMDM	Macrófagos provenientes de medula óssea
CLR	Receptores de lecitina do tipo C
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
NLRP3	Receptor do tipo NOD3
nm	Nanômetro
NK	Células assassinas naturais
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCM	Paracoccidioidomicose
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
TLR	Receptor do tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Th	Linfócito T auxiliar
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 - Introdução.....	13
1.1 - A Paracoccidioidomicose (PCM) e seu agente etiológico	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	13
1.2 - Reconhecimento fúngico pelo Sistema imune e os Receptores de Reconhecimento de Padrões.....	15
1.3 - Macrófagos e seu papel na imunidade inata	18
2 - Justificativa	20
3 - Objetivos.....	21
3.1 - Objetivo geral	21
3.2 - Objetivos específicos	21
4 - Métodos	22
4.1 - Animais experimentais.....	22
4.2 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	22
4.3 - Obtenção de macrófagos.....	22
4.4 - Infecção dos fagócitos com <i>P. brasiliensis</i>.....	23
4.5 - Agonistas de PRRs e outros reagentes.....	23
4.6 - Determinação da carga fúngica (Unidades formadoras de colônias-UFC).....	24
4.7 - Dosagem de citocinas no sobrenadante das co-culturas de fagócitos.....	24
4.8 - Dosagem de óxido nítrico no sobrenadante das co-culturas de fagócitos	24
4.9 - Análise estatística.....	25
5 - Resultados e discussão	26
5.1 - Interação entre BMDM, <i>P. brasiliensis</i> e os Agonistas de PRRs	26
5.2 - A expressão de óxido nítrico por macrófagos e a viabilidade fúngica após tratamento com agonistas	28
5.3 - Inibição da acidificação do fagolisossomo e da produção de óxido nítrico	30
6. Conclusão	33
7. Referências bibliográficas.....	34
8. Anexo	42

1 - Introdução

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

As doenças fúngicas sistêmicas em indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos tiveram um aumento significativo nas últimas três décadas, sendo considerado um problema de saúde mundial (KOHLENER *et al.*, 2015). As altas taxas de mortalidade e morbidade evidenciam a necessidade de pesquisas básicas e clínicas nesta área de grande negligência. A infecção por paracoccidioidomicose provavelmente ocorre precocemente na vida. Semelhante a outras micoses endêmicas sistêmicas, a infecção pulmonar primária não é aparente e a maioria dos indivíduos infectados permanecerá livre da doença por toda a vida. Uma pequena proporção de pacientes desenvolverá um dos dois padrões da doença: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) ou o tipo crônico ou adulto (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Em ambas as formas, a disseminação pode ocorrer e muitos órgãos podem ser afetados, especialmente os pulmões, orofaringe, linfonodos, pele com formação úlceras, glândulas suprarrenais e sistema nervoso central. A forma aguda é caracterizada por um curto período de evolução, de 15 dias a 3 meses, e é mais grave com disseminação para outros órgãos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011).

A grande predominância observada em pacientes adultos do sexo masculino não é observada em mulheres adultas jovens ou crianças (1 a 2 homens para cada mulher). A capacidade dos estrogênios em inibir a transformação de micélios ou conídios em levedura ou a maior exposição de homens do que mulheres ao solo em áreas rurais pode explicar essas diferenças. (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Se não diagnosticada, a evolução natural da paracoccidioidomicose geralmente resulta em morte. Ambas as formas clínicas podem mimetizar vários distúrbios infecciosos e não infecciosos, incluindo câncer, sarcoidose, tuberculose e histoplasmose (BELISSIMO-RODRIGUES *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELES *et al.*, 2011).

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é um dos agentes etiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM), doença sistêmica confinada na América Latina (BOCCA *et al.*, 2013). O Brasil é o centro endêmico, contando com 80% dos

casos relatados. Acometendo principalmente a população rural, a PCM é a oitava causa de mortalidade por doença crônica, entre as infecciosas e parasitárias, e a primeira entre as micoses sistêmicas no Brasil não associadas a AIDS (PRADO *et al.*, 2009; COLOMBO *et al.*, 2011). A infecção ocorre pela inalação de conídios ou fragmentos de micélio da fase saprofítica do fungo, os quais atingem primeiramente o aparelho respiratório do hospedeiro. No pulmão, ocorre a transição do micélio para a forma de levedura parasita à 37°C (RESTREPO *et al.*, 2008) (FIGURA 1).

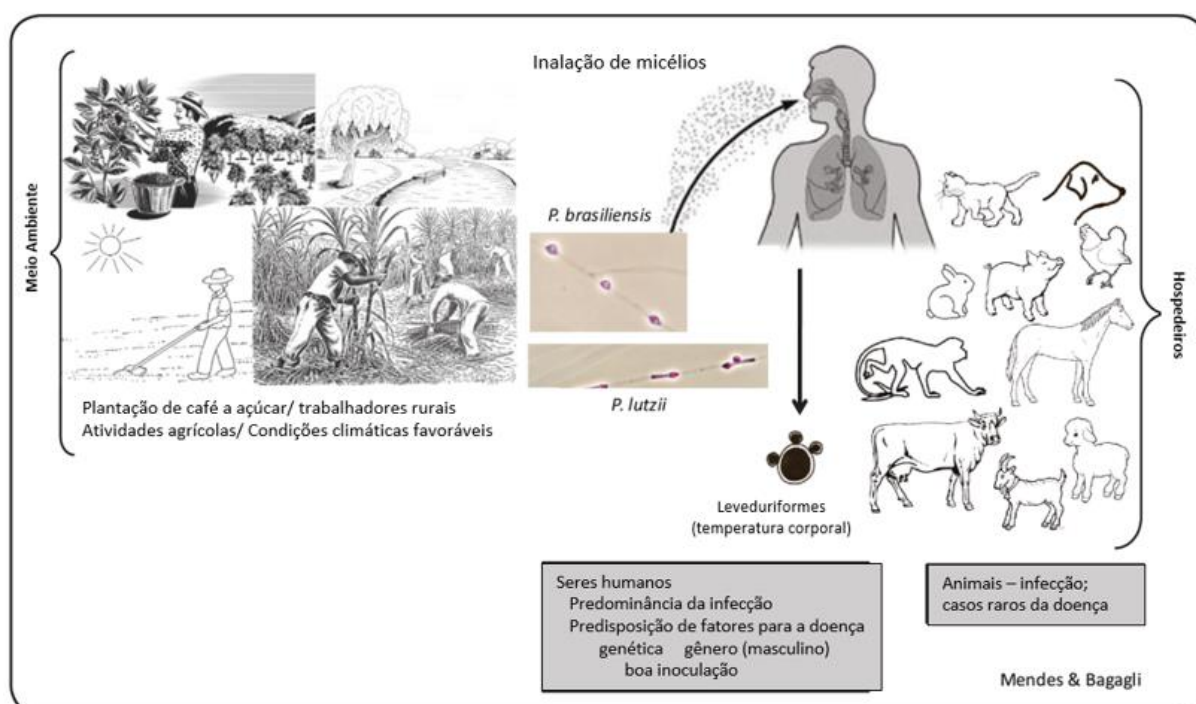


Figura 1. Propagação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (Modificado de: Shikanai Yasuda, 2017).

Este microrganismo é classificado por técnicas moleculares no filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenacea, e está próximo na árvore filogenética ao *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (SAN-BLAS *et al.*, 2008; BIALEK *et al.*, 2000). Pelo menos três espécies filogenéticas distintas, ou clados, são reconhecidas dentro do gênero (PS2, PS3 e S1) (MATUTE *et al.*, 2006). Além disso, com base em alta diversidade poligênica e características morfogenéticas exclusivas, uma espécie diferente, designada como *P. lutzii*, foi proposta (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Quando na forma de levedura o *P. brasiliensis* atua como um agente patogênico intracelular facultativo capaz de sobreviver e replicar dentro do fagossoma de macrófagos murinos e humanos não ativados. Essa habilidade é proposta como

crucial para o desenvolvimento da doença. Assim, *P. brasiliensis* pode ter desenvolvido mecanismos que neutralizam as restrições impostas pelas células fagocíticas (BRUMMER *et al.*, 1989; CALVI *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2007, TAVARES *et al.*, 2015).

A resistência do hospedeiro à infecção pelo *P. brasiliensis* e a outros fungos causadores de micose sistêmica está associada a uma resposta adaptativa a favor da ativação da capacidade microbicida ótima de macrófagos durante a infecção e apesar de não existir uma resposta polarizada clara dos padrões de subpopulações de linfócitos T auxiliares ou *helpers* (Th1, Th2, Th17 ou Treg) a secreção das citocinas IL-12 e IFN- γ , relacionadas à resposta Th1, demonstra-se protetora (CALICH *et al.*, 2008; ROMANI, 2011, VERMA *et al.*, 2014). Por outro lado, a susceptibilidade está associada a uma desativação prematura da imunidade mediada por células T, e ativação das células B, além do aumento de IL-10 ou TGF- β (FORTES *et al.*, 2011).

A PCM tem uma variedade de apresentações clínicas ao longo do curso da doença, com cada uma sendo potencialmente associada a um padrão específico de imunidade de células T (BENARD *et al.*, 2008). A maioria dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas não desenvolverão a doença. Esses indivíduos exibem um padrão de resposta imune do tipo T-*helper* (Th-1) caracterizado pela liberação de citocinas que ativam macrófagos, células TCD4 + e TCD8 +, resultando na formação de granulomas e no controle da replicação fúngica. (BENARD *et al.*, 2001; 2005)

1.2 - Reconhecimento fúngico pelo Sistema imune e os Receptores de Reconhecimento de Padrões

A resposta pulmonar à infecção é iniciada pela secreção de várias proteínas antimicrobianas pelo epitélio pulmonar e pela atividade fagocitária dos macrófagos alveolares residentes. O reconhecimento do microrganismo pela imunidade inata é mediado por receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptor*, PRRs) que interagem com estruturas de patógenos conservados, os PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) (ROMANI *et al.*, 2004) (Figura 2).

Diversos componentes da parede celular de fungos atuam como PAMPs: mananas, 1,3-1,6 β-glicana, glicoroxilomanana e fosfolipomananas, entre outros. Esses componentes são reconhecidos por distintos PRRs presentes nos fagócitos (KOPP & MEDZHITOV, 2003; ROMANI, 2011).

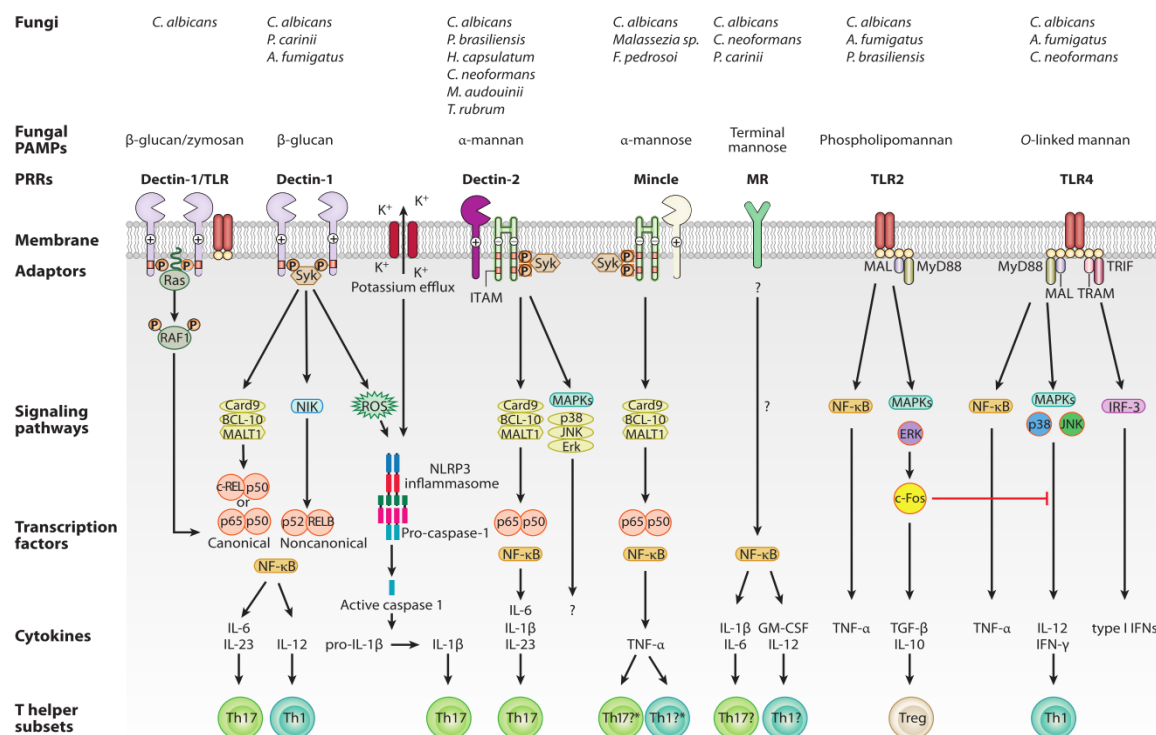


Figura 2. O reconhecimento de PAMPs fúngicos através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) presentes na membrana de células residentes no pulmão de hospedeiros, que culminam em vias de sinalização, expressão de genes e codificação de citocinas (Adaptado de: WÜTHRICH, 2012).

Em células de mamíferos, os PRRs da família Toll-Like (TLR) são proteínas transmembrana, que interagem com PAMPs e estão envolvidas na ativação do sistema imune inato. Vários componentes patogênicos típicos, como lipopolissacarídeos, flagelina, peptidoglicanos, entre outros, são reconhecidos por diferentes TLR (TAKEDA *et al*, 2003). A ativação precoce de TLR resulta na produção de vários mediadores inflamatórios e o equilíbrio final entre os componentes pró e anti-inflamatórios irá regular o tipo de resposta imune adaptativa (YANG *et al*, 1998). Os TLR foram envolvidos na resistência de hospedeiros mamíferos a vários microrganismos, incluindo patógenos fúngicos (TAKEUCHI *et al*, 1999; BOURGEOIS

et al., 2012). Especificamente, os receptores TLR-2 e TLR-4 estão associados a imunidade contra *P. brasiliensis* (LOURES *et al.*, 2009; 2010).

Considerando o longo tempo de duração e efeitos colaterais do tratamento, além do aumento da resistência aos medicamentos por isolados de *P. brasiliensis*, torna-se cada vez mais necessária a busca por alternativas terapêuticas para PCM como a utilização de agonistas que são moléculas capazes de “ativar” receptores (RANG *et al.*, 2015). Uma das principais características da doença, mimetizada em modelo murino, é sua cronicidade e imunossupressão, o que pode ser devido à capacidade do fungo em evadir-se do reconhecimento por PRRs de fagócitos do sistema imunológico inato e consequente falha na ativação protetora de uma resposta adaptativa (BOCCA *et al.*, 1999). Nesse contexto, *Paracoccidioides spp.* são caracterizados por uma estrutura distinta com diferenciação química em seus componentes da parede celular pela fase morfológica em que se encontra em um determinado momento (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

Embora a parede celular da fase micelial tenha β -(1,3)-glicana como o principal polímero de glicose, na fase de levedura com multibrotamentos há redução desse polissacarídeo ao mínimo e o mesmo é substituído pelo α -(1,3)-glicana, uma mudança que foi correlacionada com patogenicidade, uma vez que a perda espontânea do polissacarídeo está ligada à diminuição da virulência (SAN-BLAS *et al.*, 1977; PUCCIA *et al.*, 2011). Esta observação inicial relativa ao α -(1,3)-glicana como fator de virulência fúngico foi demonstrada 30 anos depois em *H. capsulatum* (RAPPEYE *et al.*, 2007). A presença de α -(1,3)-glicana na camada mais externa da parede celular da levedura de *H. capsulatum* mascara o β -(1,3)-glicana, um componente imunogênico das paredes celulares fúngicas, evitando o reconhecimento pelo PRR da família CLR (*c-type lectin receptor*) dectina-1 encontrado em células fagocíticas hospedeiras (RAPPEYE *et al.*, 2007).

Nas células de levedura de espécies de *Paracoccidioides*, a redução drástica do polissacarídeo β -(1,3)-glicana imunogênico em sua parede celular e sua substituição por α -(1,3)-glicana como camada externa quando comparada à fase micelial (CARBONELL *et al.*, 1970; PUCCIA *et al.*, 2011) pode ser uma característica

evolutiva, dificultando o reconhecimento da célula de levedura pelas células fagocíticas do hospedeiro, como em *H. capsulatum* e, portanto, atuando como um escudo protetor contra a defesa do hospedeiro. De fato, *dectina-1* tem sido extensivamente demonstrado como requerido para defesa e resistência a infecção *in vitro* e *in vivo* de *P. brasiliensis* e outros fungos causadores de infecção sistêmica (LOURES *et al.*, 2009; FERIOTI *et al.*, 2015; DAMBUZA & BROWN, 2015).

1.3 - Macrófagos e seu papel na imunidade inata

A defesa imunológica contra a infecção pelo *P. brasiliensis* é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos. A resposta inata, mediada principalmente por fagócitos, é de grande importância no controle inicial da infecção e influencia o desenvolvimento da imunidade adaptativa específica quando ocorre a persistência do patógeno (CALICH *et al.*, 2008, THIND *et al.*, 2015; LEE & LAU, 2017;). As células da imunidade inata atuam como sentinelas do sistema imunológico e são prontamente ativadas após o reconhecimento de um vasto repertório de moléculas conservadas comuns a grupos de patógenos. Este processo é mediado, como descrito anteriormente, pela interação de seus PRRs com os PAMPs desencadeando vias de sinalização celular que culminam na modulação da expressão de diversos genes, principalmente aqueles que codificam citocinas, quimiocinas e associados a produção de moléculas microbidas (CAMACHO & NIÑO-VEGA, 2017; MOGENSEN, 2009; VAN DE VEERDONK *et al.*, 2008).

A interação inicial macrófago-patógeno resulta em internalização pela célula ativada que pode matar o organismo através da ação de espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas ou contenção microbiana extracelular. Os componentes são reconhecidos por diversos PRRs presentes nos fagócitos, principalmente células dendríticas (DCs), neutrófilos e macrófagos e ativando-as (CAMACHO & NIÑO-VEGA, 2017; ROMANI, 2011; VERMA *et al.*, 2014). Os três fagócitos mencionados participam ativamente da resposta imune antifúngica, porém de forma distinta. DCs após reconhecimento fúngico mediado por seus PRRs, são essenciais na apresentação antigênica para linfócitos virgens e subsequente ativação e direcionamento da resposta adaptativa mediada por linfócitos T auxiliares. Por outro lado, neutrófilos e

macrófagos são células especializadas na fagocitose e destruição dos fungos (ROMANI, 2011; VERMA *et al.*, 2015).

Dentre as citocinas produzidas por macrófagos é importante destacar o papel da IL-1 β que é essencial para a resposta inflamatória às infecções e não é liberada pela clássica via secretora do complexo de Golgi-retículo endoplasmático. A IL-1 β é retida no citoplasma como uma forma inativa, conhecida como pró-IL-1 β (LI *et al.*, 1995). Porém, a secreção desta fundamental citocina é dependente da ativação do complexo inflamassoma NLRP3 (MARIATHASAN *et al.*, 2006) e é sabido que macrófagos indicam fracas quantidades de IL-1 β quando infectados por *P. brasiliensis* (TAVARES *et al.*, 2013). Outra considerável citocina pró-inflamatória durante o curso da Pb micose é a TNF- α , que apesar do mecanismo pouco elucidado é responsável pela formação de granulomas e consequente contenção da disseminação de leveduras para outros órgãos, além de desempenhar um papel na patogenicidade da resposta inflamatória induzida pelo fungo (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1997).

A IL-12 é uma citocina produzida principalmente por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e células dendríticas) que fornece um importante elo entre a imunidade inata e adquirida, já que direciona o desenvolvimento de linfócitos Th1 (TRINCHIERI, 1995; VIGNALLI & KUCHROO, 2012). Essa produção se dá principalmente em resposta a bactérias e parasitas intracelulares (DECKEN *et al.*, 1998; ALIBERTI *et al.*, 1996), mas também pode ser produzida por outras células, incluindo células B e neutrófilos. IL-12 a capacidade de induzir a produção de IFN- γ a partir de células NK, células T e células apresentadoras de antígenos (APC) (TRINCHIERI *et al.*, 2003). Em vários modelos murinos de infecções parasitárias ou fúngicas, descobriu-se que a IL-12 altera o curso da doença (DECKEN *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1995).

Na infecção por *P. brasiliensis*, o papel crucial dos macrófagos na resposta protetora contra a infecção é demonstrado pelo fato do bloqueio da atividade do sistema mononuclear fagocítico aumentar consideravelmente a severidade da doença em camundongos infectados por esse fungo (CALICH *et al.*, 2008).

2 - Justificativa

Caraterizada por sua cronicidade, a PCM requer um extenso período de tratamento. Os antifúngicos usados como recurso terapêutico causam graves efeitos adversos, principalmente ao fígado, o que reduz a adesão ao tratamento e mesmo utilizados de forma correta podem ter baixa eficácia.

Nesse sentido, a utilização de agonistas como estímulo de PRRs e consequente modulação da resposta imunológica tem se mostrados importante e sido cada vez mais estudada. Um estudo realizado na década de 90 em pacientes com PCM comparou o tratamento apenas com antifúngico ao tratamento com antifúngico em conjunto com a administração intravenosa de glicana proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. O progresso clínico dos pacientes que receberam o polissacarídeo foi maior do que os que foram tratados apenas com antifúngico, mesmo que o primeiro grupo tivesse inserido propositalmente os pacientes mais críticos (MEIRA *et al*, 1996).

A associação de β -1,3-glicana ao Itraconazol (antifúngico) também foi utilizada para tratar casos de cromoblastomicose, doença fúngica causada por *Fonsecaea pedrosoi*. Durante 6 anos de tratamento o paciente utilizou apenas o fármaco e não apresentou melhora clínica, porém em 6 meses de terapia associada à β -1,3-glicana as lesões foram consideravelmente contidas (AZEVEDO *et al*, 2007).

Visto que a imunoestimulação com agonistas de PRRs pode trazer ao paciente interessantes benefícios clínicos, bem como alterar o tipo de resposta imune adaptativa apresentada, estudos nesse contexto têm grande importância para determinar o potencial de diversos agonistas e investigar seu uso terapêutico na procura de novos tratamentos para doenças fúngicas.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a atividade de macrófagos murinos infectados com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com ligantes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs).

3.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a atividade dos fagócitos infectados com *P. brasiliensis* tratados com Pam3CSK4 (agonista de TLR-2/1), Zymozan (agonista de dectina-1 e TLR-2) e Zymozan Depletado (agonista de dectina-1) quanto a:
 - Produção de citocinas
 - Capacidade fungicida de macrófagos e o papel do óxido nítrico e acidificação do fagolisossomo nesse processo.

4 - Métodos

4.1 - Animais experimentais

Camundongos da linhagem isogênica C57bl/6, suscetíveis a infecção pelo *P. brasiliensis*, machos de 8 a 12 semanas de idade foram mantidos no biotério da Universidade de Brasília e utilizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética da Universidade de Brasília UnB DOC nº 117971/2014 (Anexo 1).

4.2 - *Paracoccidioides brasiliensis*

Para obtenção de células fúngicas, o isolado clínico virulento de *P. brasiliensis* Pb18, foi cultivado em meio semissólido de Fava-Neto que apresenta um pH próximo do neutro e elevada concentração de glicose. Possui rica base nutritiva, constituída por caldo de carne e extrato de leveduras. Como substâncias nutritivas suplementares utiliza-se Peptona e Proteose peptona. A isotonia do meio é mantida através do uso de cloreto de sódio. Durante 7 dias a 37°C.

4.3 - Obtenção de macrófagos

Os macrófagos foram gerados a partir da medula óssea (BMDM). Para isso, as células da medula óssea foram coletadas do fêmur e tíbia dos camundongos. As células obtidas foram filtradas em *cell strainer* de 40 µm, centrifugadas a 450 x g e os eritrócitos lisados com uma solução de cloreto de amônio. A partir da lavagem com meio RPMI. 2×10^6 células de medula óssea foram cultivadas em volume de 10 mL de meio RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino (Gibco), HEPES (agente tamponante utilizado para a manutenção de pH fisiológico), β-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 CO₂. 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 anteriormente e recolocado novamente no meio de cultura original, após 8 dias de cultura as células aderentes (macrófagos) foram coletadas. Para avaliação do processo de diferenciação os marcadores de macrófagos F480/CD11b são avaliados por citometria de fluxo periodicamente.

4.4 - Infecção dos fagócitos com *P. brasiliensis*

Após a diferenciação, os macrófagos foram coletados e infectados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* ressuspensas em meio RPMI com a razão fagócito:levedura de 2:1 (TAVARES *et al*, 2007) em placas de cultura de células de 6, 24 ou 48 poços a depender do experimento realizado. As culturas foram incubadas a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas na presença ou não de agonistas, LPS e IFN- γ , Aminoguanidina ou Bafilomicina.

4.5 - Agonistas de PRRs e outros reagentes

Os agonistas de PRRs utilizados foram: 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 (<http://www.invivogen.com/>). As seguintes concentrações de uso para os testes *in vitro* foram utilizadas: Pam3CSK4 (300 ng/ml), Zymosan (20 μ g/ml) e Zymosan depletado (100 μ g/ml) após estudo piloto utilizando três concentrações diferentes. Além desses agonistas, em alguns experimentos foi utilizado lipopolissacarideo (LPS) derivado de *Escherichia coli* sorotipo O111:B4 (500 ng/ml) e IFN- γ , Bafilomicina (*Bafilomycin A1*, 0,5 μ M) (Invivogen) e Aminoguanidina (*Aminoguanidine hemisulfate salt*, 1mM) (Sigma-Aldrich). Os dois últimos foram adicionados as culturas de BMDM 1 hora antes da infecção por leveduras de *P. brasiliensis*.

4.6 - Determinação da carga fúngica (Unidades formadoras de colônias-UFC)

Após a co-cultura de macrófagos e fungos por 24 horas, o sobrenadante foi retirado e as monocamadas tratadas com água destilada por duas ou três vezes para lise dos fagócitos. O material recolhido foi posteriormente centrifugado e ressuspensão em 1 mL de RPMI e a suspensão obtida plaqueada (100 ul/placa) em meio BHI (brain heart infusion - Difco) suplementado com Soro Fetal Bovino e dextrose anidra. As placas foram incubadas a 37°C e as colônias contadas após 5 dias.

4.7 - Dosagem de citocinas no sobrenadante das co-culturas de fagócitos

O sobrenadante retirado da co-cultura foi estocado a -20°C e posteriormente utilizado para dosagem de citocinas, pelo ensaio “enzyme-linked immunosorbent” (ELISA) empregando 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 (H₂SO₄ 2N) são preparadas manualmente no laboratório. Ao fim do ELISA, as placas foram levadas ao espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) para leitura em 450 nm. Nos sobrenadantes foram analisadas diferentes citocinas como, por exemplo, IL-1β, TNF-α e IL- 12.

4.8 - Dosagem de óxido nítrico no sobrenadante das co-culturas de fagócitos

Após estocagem a -20°C do sobrenadante das co-culturas de macrófagos foi realizada a dosagem do óxido nítrico (nitrito NO₂⁻) pelo método de Griess. A produção de óxido nítrico (NO) foi medida através do acúmulo de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos. Resumidamente, 100 ml dos sobrenadantes recolhidos foram misturados com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dihidroclorato de naftilenodiamina, 2,5% de H₃PO₄) e 10 minutos depois foi determinada a absorbância a 550 nm. A concentração de nitrito foi determinada em referência a uma curva padrão de NaNO₂ diluído em meio RPMI. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e expressas como NO₂ μM. Como controle positivo fungicida, macrófagos infectados com *P. brasiliensis* foram tratados com 20ng/ml de IFN-γ e LPS.

4.9 - 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 $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

5 - Resultados e discussão

5.1 - Interação entre BMDM, *P. brasiliensis* e os Agonistas de PRRs

Um dos aspectos essenciais da ativação de macrófagos é sua capacidade microbicida e de produzir citocinas (CALICH *et al*, 2008). Dessa maneira, inicialmente, foi avaliada a produção das citocinas produzidas por BMDM infectados com leveduras de *P. brasiliensis* e tratados ou não com os agonistas de PRRs (PAM3CSK4, Zymosan e Zymosan depletado) por 24 horas (Figura 3).

O fungo foi capaz de induzir a produção pelos macrófagos de todas as citocinas avaliadas. Houve aumento na secreção de TNF- α quando adicionados os agonistas, porém, um incremento significativo dessa secreção foi observado somente quando a célula infectada foi tratada com Zymozan depletado, agonista para Dectina-1 (Figura 3A). O TNF- α produzido por macrófagos em resposta aos componentes da parede celular do Pb é necessário para o acúmulo e diferenciação de macrófagos em células epitelióides e para a persistência de granulomas bem estruturados (FIGUEIREDO *et al*, 1993; KNDLER *et al*, 1989). De fato, Souto *et al*. (2000), utilizando camundongos deficientes geneticamente para o receptor p55 de TNF- α , observaram um infiltrado inflamatório composto de poucos neutrófilos, macrófagos e células epitelióides formando granulomas incipientes com grande número de leveduras do fungo e disseminação.

A importância do TNF- α no granuloma também foi demonstrada para humanos, pois utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) com PCM a formação *in vitro* de granuloma, em resposta a diferentes frações antigênicas de *P. brasiliensis*, estava associada a uma maior produção de TNF- α (DINIZ *et al*., 2001). Mais recentemente, Calich e colaboradores (2008) observaram que durante o curso da infecção de células aderentes de camundongos susceptíveis há uma baixa produção de TNF- α enquanto que em macrófagos peritoneais de camundongos resistentes o oposto foi visto.

Um outro padrão é visualizado para IL-1 β (Figura 3B) e IL-12p70 (Figura 3C), no qual a adição de Pam3csk4 e Zymosan foram os que induziram significativamente a produção dessas citocinas quando comparado ao grupo de células infectadas sem tratamento. Arruda et al (2002) administrando IL-12 exógena em camundongos infectados com *P. brasiliensis* demonstraram que essa citocina induz uma forma menos grave de PCM, mas com alta resposta inflamatória nos pulmões de camundongos, além disso, a produção induzida por IL-12 de alguns mediadores de ativação de macrófagos, como o TNF- α ou o óxido nítrico resultaram no aumento da capacidade fungicida dos macrófagos. *In vivo*, Livonesi et al. (2008), utilizando camundongos deficientes para a subunidade p40 da IL-12 observou que esses animais não controlavam a proliferação e disseminação fúngica. Ademais, esses animais apresentavam um número maior de granulomas frouxos com pouca produção de IFN- γ .

O *P. brasiliensis* pode desencadear a produção de pró-IL-1 β em macrófagos derivados da medula óssea, porém há uma secreção pouco significativa da proteína madura IL-1 β nessas células (TAVARES et al, 2013), como observado no presente trabalho para o grupo de macrófagos infectados não tratados com os agonistas de PRRs. Nesse contexto, macrófagos infectados com *P. brasiliensis* que tiveram o complexo do inflamassoma NLRP3 ativado e consequente produção de IL-1 β aumentaram sua capacidade fungicida mediada pelo receptor IL-1R (TAVARES et al, 2013). Assim, os agonistas Pam3csk4 e Zymosan mostraram-se significativamente efetivos em aumentar a produção de IL-1 β pelos macrófagos com potencial de elevar a capacidade fungicida dessas células (ver abaixo). A importância do complexo inflamassoma NLRP3 e produção das citocinas dependentes da sua ativação (IL-1 β e IL-18) *in vivo* na resistência a infecção pelo *P. brasiliensis* foi posteriormente observada em modelos tanto de infecção sistêmica como pulmonar de PCM (KETELUT-CARNEIRO et al., 2015, FERIOTTI et al., 2015) e outros fungos (TAVARES et al., 2015).

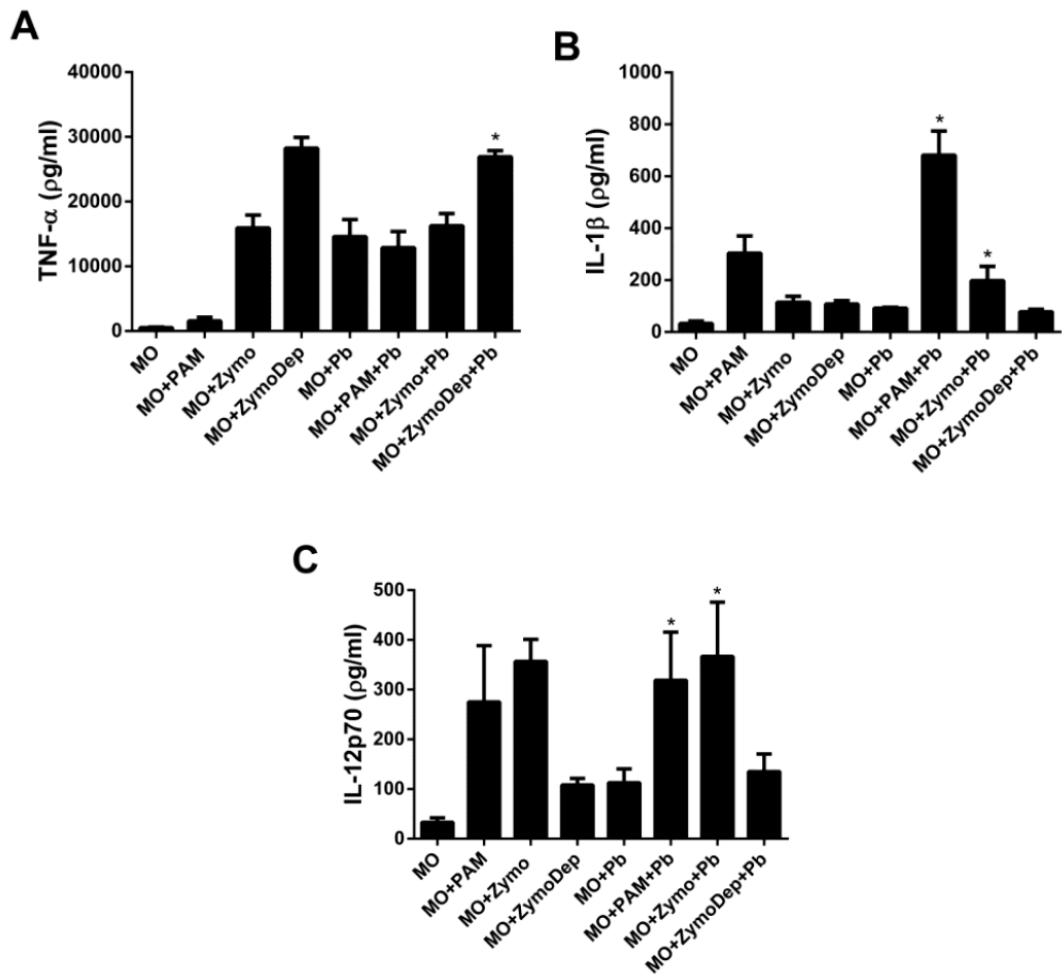


Figura 3. Secreção de citocinas por macrófagos (MO) derivados da medula óssea de camundongos e infectados com *P. brasiliensis* (Pb), tratados ou não com agonistas de PRR. TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-12p70 (C). PAM3CSK4 (PAM), Zymosan (Zymo) e Zymosan depletado (Zymo dep). * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado MO+Pb.

5.2 - A expressão de óxido nítrico por macrófagos e a viabilidade fúngica após tratamento com agonistas

A capacidade microbicida dos macrófagos é a principal defesa inata do sistema imunológico contra as infecções fúngicas. É sabido que macrófagos murinos e humanos não ativados são permissivos a multiplicação intracelular do *P. brasiliensis* (BRUMMER *et al*, 1988;1989; MOSCARDI-BACCHI *et al*, 1994; TAVARES *et al*, 2007). Dessa maneira, foi avaliado se o tratamento com os agonistas de PRRs reverteria essa incapacidade fungicida dos macrófagos.

Os macrófagos foram infectados e tratados ou não com os agonistas e os controles LPS (ativa NLRP3 e possivelmente a expressão IL-1 β por macrófagos infectados com Pb (TAVARES *et al*, 2013)) e IFN- γ , um ativador de macrófagos infectados, induzindo-os a secretar TNF- α e inibindo a replicação do Pb (BRUMMER *et al*, 1988) e após 24h os BMDMs foram lisados e o produto plaqueado para determinação de UFC.

Como mostrado na Figura 4A, a atividade dos agonistas Zymosan e Zymosan Depletado aumentou a capacidade fungicida dos macrófagos, a níveis comparáveis ao do grupo controle tratado com LPS e IFN- γ . Porém, nota-se que o grupo tratado com PAM3CSK4 se assemelha ao grupo não tratado, apresentando maiores quantidades de fungos viáveis. A fim de entender o mecanismo microbicida imposto pela atividade de Zymosan e Zymosan Depletado e sabendo que a ativação de macrófagos leva à expressão de substâncias microbicidas como o óxido nítrico, principal molécula fungicida associada ao *P. brasiliensis* (BOCCA *et al*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2002), avaliamos a sua produção (na forma de nitrito) no sobrenadante das culturas (Figura 4B).

O tratamento com Zymosan e LPS+IFN induziram altos níveis de nitrito, o que sugere que esse elemento seja importante na atividade fungicida já que os dois grupos reduziram significativamente a carga fúngica. Porém, Zymosan Depletado não induz quantidades de nitrito significativas sugerindo outro mecanismo fungicida induzido por esse agonista.

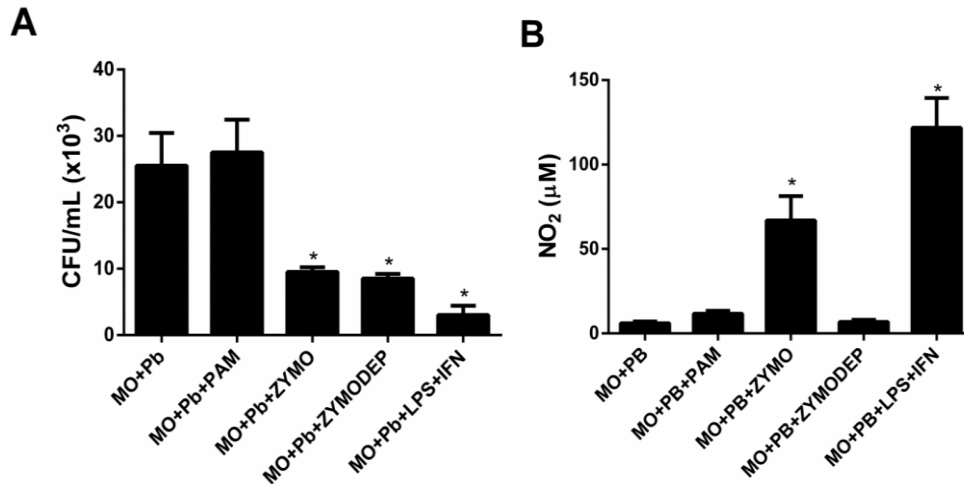


Figura 4. Atividade fungicida de macrófagos (MO) murinos tratados com agonistas de PRRs frente ao *P. brasiliensis* (A) e produção de óxido nítrico (na forma de nitrito) (B). PAM3CSK4 (PAM), Zymosan (Zymo) e Zymosan depletado (Zymo dep). LPS e IFN- γ : controle positivo. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado MO+Pb. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

5.3 - Inibição da acidificação do fagolisossomo e da produção de óxido nítrico

Para avaliar se a produção de Oxido Nítrico e a acidificação do fagolisossomo está relacionada à capacidade fungicida dos macrófagos tratados com os agonistas Zymosan e Zymosan Depletado, uma hora antes do desafio das células com *P. brasiliensis* foi adicionado às culturas 0,5 μ M de Bafilomicina A1 e 1mM de Aminoguanidina.

Bafilomicina A1 é um inibidor conhecido que atua na fase tardia da autofagia, processo de autodestruição da célula. A Bafilomicina A1 previne a maturação dos vacúolos autofágicos pela inibição da fusão entre autofagossomos e lisossomos. A Bafilomicina A1 atua inibindo a H⁺ATPase vacuolar (V-ATPase) (YAMAMOTO *et al*, 1998). Quando adicionada a Bafilomicina A1 às culturas, houve reversão da capacidade microbicida de macrófagos tratados com Zymosan Depletado (Figura 5A), sugerindo que a acidificação do fagolisossomo é o principal mecanismo microbicida induzido por esse ligante de dectina-1.

Yoshimori e colaboradores (1991), mostraram que a H⁺ATPase do tipo vacuolar desempenha um papel crucial na acidificação e degradação proteica nos lisossomos em culturas de células BNL CL.2 e A431. Em fungos, a morte eficiente de *C. albicans* e *Histoplasma capsulatum* requer maturação fagolisossômica, independente da função do óxido nítrico (NEWMAN *et al*, 2005; GILDEA *et al*, 2005).

Por outro lado, Zymosan (ligante de dectina-1 e TLR-2) teve seu efeito fungicida revertido quando as culturas foram tratadas com Aminoguanidina, inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CORBETT *et al*, 1993) e Bafilomicina A1, sugerindo que tanto a acidificação do fagolisossomo como a produção do radical de nitrogênio são importantes na atividade fungicida induzida em macrófagos infectados por *P. brasiliensis*. Em fagossomos contendo *Candida albicans* ou β -glicana, ligantes de dectin-1, a acidificação e consequente maturação do fagossomo é dependente desse receptor (MANSOUR *et al*, 2013).

Tomados em conjunto, estes resultados suportam um modelo no qual dectina-1, não só controla a internalização de β -glicana e desencadeia citocinas pró-inflamatórias, mas também atua como um regulador para a subsequente maturação fagolisossomal. Importante notar na Figura 5B a eficácia do tratamento com Aminoguanidina na inibição da produção de óxido nítrico.

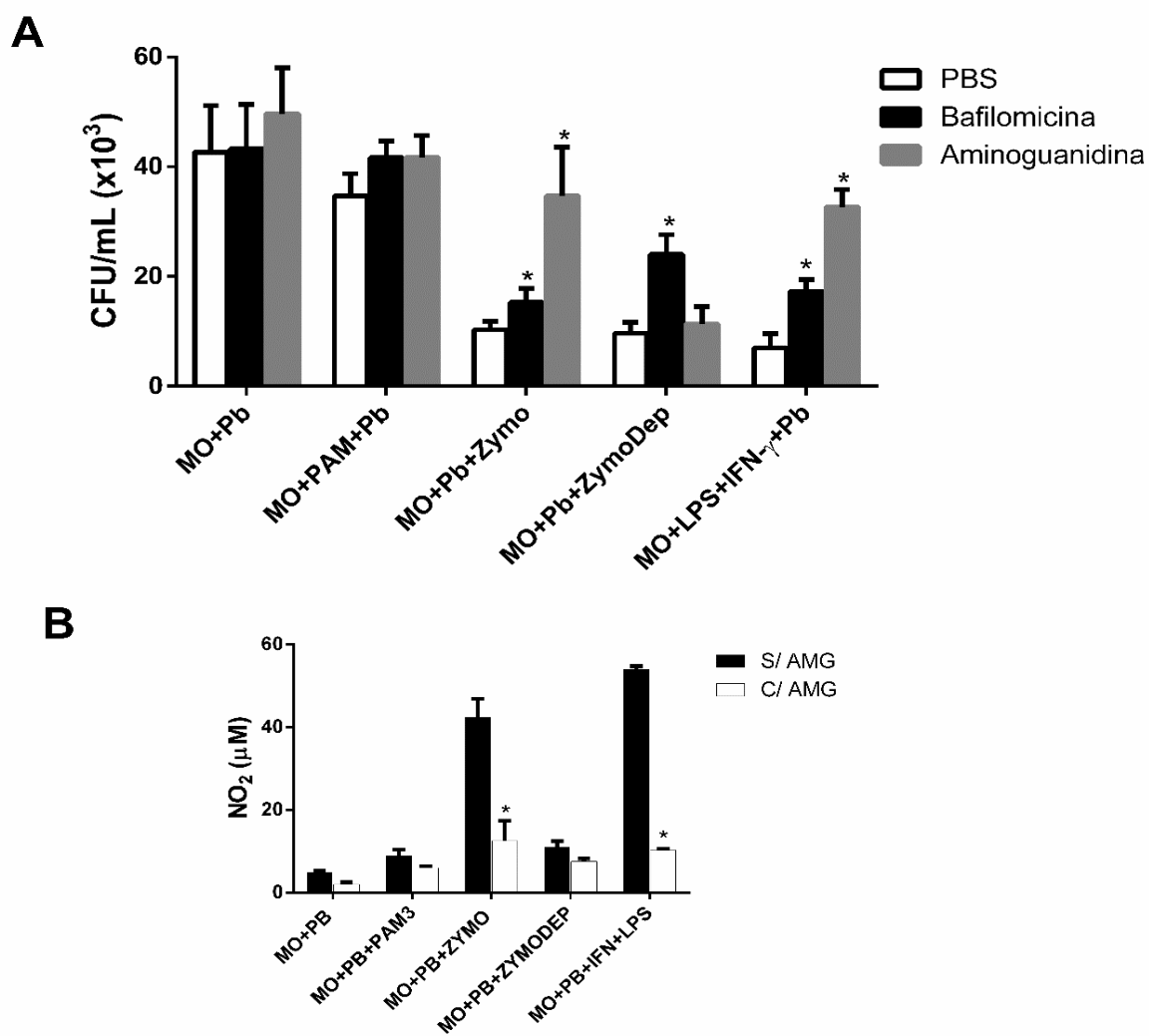


Figura 5. (A) Avaliação do efeito fungicida do tratamento com agonista de PRRs em macrófagos tratados ou não com Bafilomicina e Aminoguanidina. Macrófagos infectados e tratados com PAM3CSK4, Zymozan e Zymozan Depletado ou LPS e IFN- γ na presença ou ausência de Bafilomicina. **(B)** Dosagem de óxido nítrico secretado por macrófagos tratados com agonistas de PRRs na presença e ausência de Aminoguanidina. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado MO+Pb(PBS). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

6. Conclusão

O conjunto de resultados obtidos nesse trabalho traz a importância da utilização de agonistas de PRRs na modulação da atividade de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos frente à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, com a melhora significativa das respostas da principal célula microbicida atuante na imunidade inata.

Foi observado que PAM3CSK4, Zymosan e Zymosan Depletado induzem a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β e IL-12p70, que atuam significativamente em infecções fúngicas. Os agonistas Zymosan e Zymosan Depletado também aparecem intervindo de forma interessante na redução da viabilidade do fungo mesmo quando há redução da acidificação do fagolisossomo, fator que dificulta a capacidade fungicida dos macrófagos. Ainda nesse contexto, os resultados dos experimentos apresentam a eficácia do papel do Zymosan na modulação dos receptores Dectina-1 e TLR-2 mesmo na presença do inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), quando se compara com as quantidades de unidades formadoras de colônia dos grupos sem tratamento ou tratados com os outros agonistas.

O principal desfecho obtido com os resultados apresentados é visto com os resultados da utilização do agonista Zymosan, pois se mostra como o mais íntegro dentre os estudados. Mesmo não apresentando níveis significativos da secreção de TNF- α , por exemplo, ele mostra-se eficaz na utilização de duas vias fungicidas como mecanismo de eliminação do *P. brasiliensis*. O que o elege como o tratamento mais robusto diante do controle da infecção fúngica nesse estudo.

A resposta imune natural responsável por combater fungos é dependente do trabalho em conjunto de PRRs, que reconhecem diferentes PAMPs e ativam a produção de citocinas e substâncias capazes de destruir esses microrganismos. Sendo assim, os TLRs e dectina-1, bem como a utilização dos agonistas PAM3CSK4, Zymosan Depletado e Zymosan para esses receptores podem ser considerados alvos terapêuticos complementares ao tratamento convencional do hospedeiro contra a paracoccidioidomicose.

7. Referências bibliográficas

ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 1961-1967, 1996.

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.

BELLISSIMO-RODRIGUES, Fernando; MACHADO, Alcyone Artioli; MARTINEZ, Roberto. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BENARD, Gil et al. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-252, 2001.

BENARD, Gil et al. Contribution to the natural history of paracoccidioidomycosis: identification of the primary pulmonary infection in the severe acute form of the disease—a case report. **Clinical infectious diseases**, v. 40, n. 1, p. e1-e4, 2005.

BIALEK, Ralf et al. Small Subunit Ribosomal DNA Sequence Shows *Paracoccidioides brasiliensis* Closely Related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3190-3193, 2000.

BOCCA, Anamélia L. et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, 1998.

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.

BOCCA, Anamelia Lorenzetti et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177-1191, 2013.

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

BOURGEOIS, Christelle; KUCHLER, Karl. Fungal pathogens—a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 142, 2012.

BRUMMER, Elmer et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and immunity**, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, 1989.

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

CALVI, Sueli A. et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and infection**, v. 5, n. 2, p. 107-113, 2003.

CAMACHO, Emma; NIÑO-VEGA, Gustavo A. *Paracoccidioides Spp.*: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

CARBONELL, Luiz M.; KANETSUNA, Fuminori; GIL, Filipa. Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 636-642, 1970.

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

CORBETT, John A. et al. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**, v. 41, n. 4, p. 552-556, 1992.

DAMBUZA, Ivy M.; BROWN, Gordon D. C-type lectins in immunity: recent developments. **Current opinion in immunology**, v. 32, p. 21-27, 2015.

DECKEN, Klaus et al. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 10, p. 4994-5000, 1998.

DINIZ, Susana N. et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Human immunology**, v. 62, n. 8, p. 799-808, 2001.

E SILVA AZEVEDO, Conceição de Maria Pedrozo 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.

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, p. 913, 2015.

FIGUEIREDO, F.; ALVES, L. M. C.; SILVA, C. L. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 93, n. 2, p. 189-194, 1993.

FORTES, Maria Rita Parise et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.

GILDEA, Lucy A. et al. Human dendritic cell activity against *Histoplasma capsulatum* is mediated via phagolysosomal fusion. **Infection and immunity**, v. 73, n. 10, p. 6803-6811, 2005.

KETELUT-CARNEIRO, Natália et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 9, p. 4507-4517, 2015.

KINDLER, Vincent et al. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 731-740, 1989.

KÖHLER, Julia R.; CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, p. a019273, 2015.

KOPP, Elizabeth; MEDZHITOV, Ruslan. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 4, p. 396-401, 2003.

LEE, Pamela P.; LAU, Yu-Lung. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 735, 2017.

LI, Ping et al. Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, n. 3, p. 401-411, 1995.

LIVONESI, Márcia Cristina et al. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Medical mycology**, v. 46, n. 7, p. 637-646, 2008.

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. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 1078-1088, 2010.

MANSOUR, Michael K. et al. Dectin-1 activation controls maturation of β -1, 3-glucan-containing phagosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 22, p. 16043-16054, 2013.

MARIATHASAN, Sanjeev et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228, 2006.

MATUTE, Daniel R. et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2153-2157, 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.

MOGENSEN, Trine H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.

MOSCARDI-BACCHI, Maura; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **Journal of medical microbiology**, v. 40, n. 3, p. 159-164, 1994.

NASCIMENTO, Flávia RF et al. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, 2002.

NEWMAN, Simon L. et al. Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. **Infection and immunity**, v. 73, n. 2, p. 770-777, 2005.

PRADO, Marli et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

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.

QUEIROZ-TELLES, Flavio; ESCUISSATO, Dante L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2011. p. 764-774.

QUEIROZ-TELLES, Flavio et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.

RANG, Rang et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

RAPPLEYE, Chad A.; EISSENBERG, Linda Groppe; GOLDMAN, William E. *Histoplasma capsulatum* α -(1, 3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1366-1370, 2007.

RESTREPO, Angela et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2008. p. 182-197.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275, 2011.

SAN-BLAS, Gioconda; SAN-BLAS, F.; SERRANO, L. E. Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. **Infection and immunity**, v. 15, n. 2, p. 343-346, 1977.

SAN-BLAS, Gioconda; NINO-VEGA, Gustavo. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 183, 2008.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

SILVA, Marcelo Fernandes da et al. Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 109, n. 2, p. 261-271, 1997.

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

TAKEDA, Kiyoshi; KAISHO, Tsuneyasu; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI, Osamu et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-451, 1999.

TAVARES, Aldo Henrique FP et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes and infection**, v. 9, n. 5, p. 583-590, 2007.

TAVARES, Aldo Henrique et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, 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 pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.

TEIXEIRA, Marcus M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, n. 2, p. 273-283, 2009.

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: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual review of immunology**, v. 13, n. 1, p. 251-276, 1995.

TRINCHIERI, Giorgio; PFLANZ, Stefan; KASTELEIN, Robert A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641-644, 2003.

VAN DE VEERDONK, Frank L. et al. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 305-312, 2008.

VERMA, Akash et al. Adaptive immunity to fungi. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 3, p. a019612, 2015.

VIGNALI, Dario AA; KUCHROO, Vijay K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature immunology**, v. 13, n. 8, p. 722, 2012.

WÜTHRICH, Marcel; DEEPE JR, George S.; KLEIN, Bruce. Adaptive immunity to fungi. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 115-148, 2012.

YAMAMOTO, Akitsugu et al. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. **Cell structure and function**, v. 23, n. 1, p. 33-42, 1998.

YANG, Ruey-Bing et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 284, 1998.

YOSHIMORI, Tamotsu et al. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H (+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 26, p. 17707-17712, 1991.

ZHOU, Ping et al. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 2, p. 785-795, 1995.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 16 de agosto de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**PAPEL DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO (PRRS) NA INFECÇÃO MURINA POR PATÓGENOS FÚNGICOS.**", UnBDoC n.º 55924/2016, sob responsabilidade do Professor Aldo Henrique F P Tavares foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *MUS MUSCULUS* (120 machos). A presente aprovação é válida pelo período de 14/06/2016 a 1º/01/2020.



Prof. Paula Diniz Galera

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Cóordenadora da CEUA – UnB



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