



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA**

**Avaliação do papel dos receptores de reconhecimento de  
padrões Dectina-2 e Dectina-3 na infecção experimental por  
*Paracoccidioides brasiliensis***

**MARIANA DE RESENDE DAMAS CARDOSO MIGUEL**

**BRASÍLIA-DF**

**2019**

**MARIANA DE RESENDE DAMAS CARDOSO MIGUEL**

**Avaliação do papel dos receptores de reconhecimento de  
padrões Dectina-2 e Dectina-3 na infecção experimental por  
*Paracoccidioides brasiliensis***

Tese apresentada à Universidade de  
Brasília como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor pelo  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Microbiana.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

**BRASÍLIA-DF**

**2019**

Aos meus pais, porque dedicaram suas vidas por nós e não medem esforços para que  
alcancemos nossa plena felicidade e vocação;

Ao meu marido, porque se propôs a me dedicar seu presente e seu futuro;

Aos meus alunos, por serem parte do sentido de tudo isso. Por favor, dediquem-se a construir  
um futuro melhor...

## AGRADECIMENTOS

**À minha Família**, em especial aos meus pais, que sempre nos ensinaram que a educação é essencial; que o sacrifício vale a pena; que Deus é fiel. Esses valores são a nossa maior herança! Agradeço também à minha irmã, Carolina, e ao meu irmão, Pedro, por estarem presentes na minha vida, mesmo que distantes. Vocês são meus melhores amigos; os melhores presentes que nossos pais me deram!

À Carolina, ainda, pelos conselhos, pelos almoços, pelos desabafos, pela companhia no tédio e pelo conforto na ansiedade...

**Ao meu esposo**, Daniel, primeiramente por insistir que eu prestasse a seleção de doutorado e começasse esse novo desafio. E depois, por estar ao meu lado em todos os momentos, ajudando-me nas pequenas e grandes coisas da vida cotidiana e da vida de laboratório. Obrigada por me ouvir reclamar; obrigada por me ouvir falar empolgada sobre algo que você quis aprender – imunologia –; obrigada por acreditar em mim esse tempo todo!

**Ao meu orientador**, Aldo, por aceitar me orientar mesmo sem me conhecer; por consentir que eu trabalhasse fora, mesmo sabendo que muitas vezes seria difícil; por estar sempre disposto a me ensinar práticas e teorias da pesquisa; por entender minhas ausências, quando necessárias.

**À professora** Anamélia, por me receber no laboratório com toda confiança; por toda a paciência e aprendizado; por me recomendar ao Aldo; por ser exemplo de mulher, professora e pesquisadora.

**Aos colegas do laboratório**, Clara, Pedro, Raffael, Stephan, Luisa, Karina, Paulo, Nadinne, Camille, Isabel, Lucas, Ludmyla, Arthemina, Carol, Thais (as duas!), Angelina, Jonathan, pelo companheirismo; pelas horas difíceis e felizes; por todo o aprendizado, pela ajuda em experimentos (mesmo aqueles que duraram até altas horas da noite)!

Agradeço especialmente à Dawanne e à Gabriela, por toda amizade e por estarem comigo no início e me ensinarem o básico – como a trabalhar com fungos e usar a autoclave – e aquilo que não era tão básico assim... Nunca esquecerei, meninas!

Agradeço à Camila, pela amizade, pelos cafés, pelas conversas, pelos conselhos, pelos desabafos, pelas risadas, pela confiança!

Agradeço ao Guilherme, por deixar uma parte da sua história entre nós. Isso o tempo não pode apagar...

**Aos meus amigos**, Ester, Glenda, Luanda, Thaíza, Gabi, Tereza, Rômulo, Ana Lúcia, Dante, Izabela, por serem presença concreta na minha vida em todos os momentos. Alguns, por me acompanharem desde a época da graduação; outros, por me receberem em Brasília; todos, por acreditarem em mim, por serem ouvidos nas horas que eu precisava chorar, por serem abraço nas horas que eu precisava descansar... Por serem consolo nos momentos em que eu me sentia só... Por serem esperança quando tudo ainda parecia distante; pelas orações... Vocês foram – e ainda são – parte da minha história; parte de mim!

**À Carolina e ao Daniel**, por serem meus revisores profissionais (mesmo tendo outras profissões); pela paciência e dedicação em lerem – e corrigirem, e formatarem – essa tese.

**À Raíssa**, técnica do laboratório de histopatologia da UnB, pela ajuda na realização da confecção das lâminas, por sua simpatia e zelo.

**Aos colegas de trabalho do IFG**, Camilla, José João, Meire, Simone, Camila, Rosmany, Gabi, Andréia, Marizângela e todos os outros, por todos os momentos de amizade e partilha; pelo profissionalismo e dedicação; pelo exemplo e atitudes.

**Aos meus professores** do ensino básico, da graduação e da pós-graduação. Por me ensinarem além dos conteúdos, por ensinarem sem palavras, por meio de exemplos, a perseverar, a fazer tudo com dedicação e, principalmente, a não perder a paciência e o foco.

**Agradeço a Deus**, por ser Aquele ao qual eu me volto dia e noite; por ser a ternura do meu coração e a minha esperança; por ser Aquele que eu entreguei – e entrego – minha vida, minhas decisões e todos os meus passos... Por ser o infinito do qual minha alma sente saudades; por ser a razão de tudo...

*“Esta história, não há dúvida, vai-se convertendo em um novelo bem emaranhado; mas eu não sou capaz de coisa melhor; escrevo o que me acode ao pensamento, deito a linha aqui e ali no ribeirinho do meu coração e vou-lhe apresentando os peixinhos que pesco, à medida que eles vão caindo.”*

*(Santa Teresa de Lisieux)*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Paracoccidiodomicose e <i>Paracoccidioides sp.</i> .....	16
1.2 A resposta imunológica diante da infecção por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	20
1.3 Receptores do tipo NOD (NLRs).....	23
1.4 Receptores do tipo Toll (TLRs) .....	24
1.5 Receptores Lectinas do tipo C – CLR's .....	27
1.5.1 Dectina-1 .....	30
1.5.2 Receptor de Manose (MR)/CD206.....	31
1.5.3 DC-SIGN .....	32
1.5.4 Dectina-2 .....	32
1.5.5 Dectina-3 e Mincle (Macrophage inducible C-type lectin), .....	34
2 JUSTIFICATIVA.....	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral .....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.1 Análises <i>in vitro</i> .....	41
4.1.1 Obtenção de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> . .....	41
4.1.2 Obtenção de células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea e infecção por <i>P. brasiliensis</i> . .....	41
4.1.3 Análise <i>in vitro</i> de indução de resposta complementar entre os receptores Dectina-1 e Dectina-2, Dectina-3 e Mincle.....	43
4.1.4 Obtenção de linfócitos T e co-cultura com BMDCs .....	43
4.1.5 Análise da maturação de BMDCs deficientes de Dectina-2 e 3 diante da infecção por <i>P. brasiliensis</i> . .....	44
4.1.6 Determinação da atividade fungicida de macrófagos.....	44
4.1.7 Determinação do índice de fagocitose/interação de <i>P. brasiliensis</i> com BMDMs. 45	
4.1.8 Avaliação da produção de NO por BMDMs infectados.....	45
4.1.9 Avaliação da produção de citocinas e quimiocina por ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA).....	45
4.2 Análises <i>in vivo</i> .....	46
4.2.1 Infecção de camundongos. ....	46
4.2.2 Análises histopatológicas. ....	48

4.3	Análise estatística. ....	48
5	RESULTADOS .....	49
5.1	CLRs são essenciais para o reconhecimento de <i>P. brasiliensis</i> por BMDCs .....	49
5.2	Dectina-2 é necessária para a sobrevivência de camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i> . ....	52
5.3	Dectina-2 – e não Dectina-3 – é essencial para a indução da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ por fagócitos murinos na infecção por <i>P. brasiliensis</i> .....	54
5.4	Interação entre Dectina-1 e Dectina-2, Dectina-3 e Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ por BMDCs infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . ....	57
5.5	Dectina-2 é necessária para a atividade fagocítica e fungicida de macrófagos murinos na infecção <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> . ....	63
5.6	A resposta imune adaptativa protetora contra <i>P. brasiliensis</i> é dependente de Dectina-2 em modelo de infecção <i>in vitro</i> .....	69
5.7	O controle da infecção por <i>P. brasiliensis</i> em camundongos é parcialmente dependente de Dectina-2.....	73
6	DISCUSSÃO.....	79
7	CONCLUSÕES.....	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## LISTA DE ABREVIACÕES

**Bcl-10**- B-cell lymphoma/leukemia 10

**BHI**- Brain Heart Infusion

**BMDC**- Bone Marrow-Derived Dendritic Cells (Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea)

**BMDM**- Bone Marrow-Derived Macrophages (Macrófagos Derivados de Medula Óssea)

**CARD9**- Caspase recruitment domain-containing protein 9

**CD**- Cluster of differentiation

**CFU**- Colony-forming Unit (Unidade formadora de colônia – UFC)

**CLRs**- C- Type Lectin Receptors (Receptores Lectina do Tipo C)

**CRD**- Carbohydrate Recognition Domain (Domínio de Reconhecimento de Carboidratos)

**CTLD**- C-type lectin-like domain

**DAG**- Diacylglycerol

**DAMPs** – Damage-Associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados a Danos)

**DCIR**- Dendritic cell immunoreceptor

**DC-SIGN**- Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin

**GM-CSF**- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**IFN- $\gamma$**  – Interferon- gamma

**IKK**- Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase

**ILs** – Interleucinas

**ITAM**- Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

**ITIM**- Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

**I $\kappa$ B**- Inhibitor of kappa B

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**Malt1**- Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1

**MAPKs**- Mitogen-Activated Protein Kinases

**MHC-II**- Major Histocompatibility Complex II

**MICL**- Myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor

**Mincle**- Macrophage inducible C-type lectin

**MR** – Mannose Receptor (Receptor de Manose)

**MyD88**- Myeloid Differentiation Primary Response 88

**NFAT**- Nuclear factor of activated T cells

**NF- $\kappa$ B**- Factor Nuclear kappa B  
**NIK**- NF-kappa-B-inducing kinase  
**NLRs** - NOD-Like Receptors  
**NO**- Nitric-oxide (Óxido Nítrico)  
**NOD** - Nucleotide-binding Oligomerization Domain  
**PAMPs** – Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)  
**PCM** – Paracoccidioidomicose  
**PI3K**- Phosphoinositide 3-kinase  
**PKC**- Proteína quinase C  
**PKC $\delta$** -- Proteína quinase C- $\delta$   
**PLC $\gamma$ 2**- Phospholipase C $\gamma$ 2  
**PRR** – Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconhecimento de Padrões)  
**RLRs** – RIG-I-Like Receptor  
**ROS**- Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)  
**SFB**- Soro Fetal Bovino  
**Syk**- Spleen Tyrosine Kinase  
**TAMPs** – Tumours Associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados a Tumores)  
**TDM**- Trehalose-6,6'-dimycolate  
**TGF- $\beta$** - Transforming Growth Factor beta  
**TLRs** - Toll-Like Receptors  
**TNF- $\alpha$**  - Tumor Necrosis Factor alpha  
**UFC**- Unidade Formadora de Colônia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do gênero <i>Paracoccidioides</i> sp. na América do Sul. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). .....	18
Figura 2. Propagação de <i>Paracoccidioides</i> spp. (Adaptado de SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). .....	18
Figura 3. Sinalização intracelular mediada por TLRs (Adaptado de MEDZHITOV, 2001). .	25
Figura 4. Representação esquemática dos receptores de Lectina do tipo C, seus respectivos ligantes e vias de ativação dependentes ou independentes de SyK (Adaptado de HOVING; WILSON; BROWN, 2014). .....	28
Figura 5 Representação esquemática da via de sinalização de Dectina-1 a partir da ligação com $\beta$ -glucana (Adaptado de PLATO; WILLMENT; BROWN, 2013). .....	29
Figura 6. Representação esquemática das vias de sinalização de Dectina-2 com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$ (SANCHO; SOUZA, 2012). .....	33
Figura 7. Representação esquemática da via de sinalização de Dectina-3 com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$ , a partir de sua ligação com TDM (adaptado de RICHARDSON; WILLIAMS, 2014). .....	35
Figura 8. Representação esquemática da via de sinalização do heterodímero de Dectina-3 e Mincle com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$ a partir de sua ligação com a molécula TDM (adaptado de RICHARDSON; WILLIAMS, 2014). .....	36
Figura 9. A secreção de TNF- $\alpha$ por BMDCs infectadas por <i>P. brasiliensis</i> é dependente de Receptores de Lectina do Tipo-C, especialmente Dectina-1 e Dectina-2. ....	51
Figura 10. Dectina-2 desempenha um importante papel para a sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por <i>P. brasiliensis</i> . .....	53
Figura 11. Cinética da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 IL-1 $\beta$ e CCL2 por BMDCs e BMDMs deficientes de Dectina-2 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . .....	55
Figura 12. Cinética da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 IL-1 $\beta$ e CCL2 por BMDCs e BMDMs deficientes de Dectina-3 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . .....	56
Figura 13. Não há interação de Dectina-2 com Dectina-1 ou Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ por BMDCs infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . .....	59
Figura 14. Não há interação de Dectina-3 com Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ por BMDCs infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . .....	62
Figura 15. Dectina-2 está envolvida na atividade fagocítica de BMDMs. ....	65
Figura 16. Dectina-2 está envolvida na atividade fungicida de BMDMs. ....	65
Figura 17. A deficiência de Dectina-2 afeta a produção de NO por BMDMs. ....	66

Figura 18. Dectina-3 não está envolvida na atividade fagocítica de BMDMs.....	67
Figura 19. Dectina-3 não está envolvida na atividade fungicida de BMDMs.....	67
Figura 20. A deficiência de Dectina-3 não afeta a produção de NO por BMDMs. ....	68
Figura 21. Expressão de moléculas co-estimulatórias por BMDCs selvagens e deficientes de Dectina-2 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . ....	70
Figura 22. Dectina-2 contribui para a indução de resposta Th1 <i>in vitro</i> . Avaliação da secreção de IFN- $\gamma$ .....	71
Figura 23. Expressão de moléculas co-estimulatórias por BMDCs selvagens e deficientes de Dectina-3 infectadas por <i>P. brasiliensis</i> . ....	72
Figura 24. Secreção de citocinas no pulmão e fígado de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por <i>P. brasiliensis</i> . ....	75
Figura 25. Crescimento fúngico no pulmão de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por <i>P. brasiliensis</i> . ....	76
Figura 26. Análise histopatológica de pulmão de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por <i>P. brasiliensis</i> . ....	78

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 . Representação dos grupos de animais infectados para análise de sobrevivência....47

Tabela 2 Representação dos grupos de animais infectados para análises histopatológicas, produção de citocinas e contagem de leveduras viáveis recuperadas. ....47

## RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica causada pelo fungo dimórfico do gênero *Paracoccidioides* spp., podendo afetar tanto indivíduos imunocomprometidos como aqueles imunocompetentes. A PCM tem alta incidência em países da América Latina, principalmente no Brasil. O perfil de resposta Th1 está associado a uma maior proteção contra o *P. brasiliensis* e o envolvimento de células da resposta imune inata é essencial para o direcionamento dessa resposta. Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) são importantes para o reconhecimento inicial de patógenos, e lectinas do tipo C, um tipo de PRR, são cruciais no reconhecimento de fungos. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel dos receptores Dectina-2 e Dectina-3 na infecção por *P. brasiliensis*. Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de linhagens de camundongos do tipo selvagem e deficientes de cada receptor foram infectadas por *P. brasiliensis* para as análises *in vitro*. Para a verificação de resposta *in vivo*, camundongos selvagens e deficientes de Dectina-2 ou Dectina-3 foram infectados pelo fungo para a averiguação de suas sobrevivências. Por fim, infectou-se novamente os animais deficientes de Dectina-2 para coleta de órgãos e análise de UFC, histopatologia e citocinas. Fagócitos deficientes de Dectina-2 produziram significativamente menor quantidade de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10) em comparação com os selvagens e BMDMs deficientes apresentaram menor capacidade fagocítica e fungicida. Não houve detecção de atividade complementar entre os receptores estudados. Linfócitos T selvagens cultivados com BMDCs deficientes de Dectina-2 produziram menores quantidades de IFN- $\gamma$  e maiores quantidades de IL-13, demonstrando a relevância de Dectina-2 na indução de resposta imune protetora contra *P. brasiliensis* em modelos de infecção *in vitro*. Os animais deficientes de Dectina-2 apresentaram menor produção de citocinas pró-inflamatórias e maior produção daquelas reguladoras, fazendo com que houvesse maior detecção de UFC em seus pulmões e resultando em uma sobrevivência significativamente afetada. Por sua vez, as células deficientes de Dectina-3 não apresentaram diferença significativa de produção de citocinas, expressão de moléculas co-estimulatórias, fagocitose e atividade fungicida em relação ao controle. Além disso, os camundongos infectados deficientes do receptor não apresentaram maior susceptibilidade diante da infecção por *P. brasiliensis*. Em conjunto, tais resultados indicam que Dectina-2 – e não Dectina 3 - desempenha um importante papel na indução de resposta imune protetora contra *P. brasiliensis*.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Receptores de Reconhecimento Padrão, Dectina-2, Dectina-3.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic disease caused by the dimorphic fungus of the genus *Paracoccidioides* spp., which may affect both immunocompromised and immunocompetent individuals. PCM has a high incidence in Latin American, mainly in Brazil. The Th1 immune response is associated with a greater protection against the disease and the involvement of the innate immunity is essential for targeting this response. Pattern Recognition Receptors (PRRs) are important for the initial recognition of pathogens, and C type lectins (CLRs) are crucial in the recognition of fungi. Thus, the objective of the study is to evaluate the role of Dectin-2 and Dectin-3 in *P. brasiliensis* infection. Dectin-2 and Dectin-3 knockout BMDCs and BMDMs were infected with the fungus for the *in vitro* analyses. For the *in vivo* analysis, Dectin-2 and Dectin-3 knockout mice were infected by *P. brasiliensis* and their survival were assessed. Furthermore, Dectin-2 knockout mice were infected and sacrificed with 30 and 60 days after infection for CFU, histopathology analysis and cytokine production in lungs and liver. Dectin-2 knockout phagocytes produced significantly lower amounts of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-10) compared to wild-type and Dectin-2 deficient BMDMs had lower phagocytic and fungicidal capacity. There was no detection of complementary activity among the CLRs studied. T lymphocytes cultured with Dectin-2 knockout BMDCs produced lower amounts of IFN- $\gamma$  and higher amounts of IL-13, demonstrating the relevance of Dectin-2 in inducing a protective immune response against *P. brasiliensis* *in vitro*. Dectin-2-deficient mice had lower production of pro-inflammatory cytokines and increased production of the regulatory ones. They presented higher CFUs in their lungs and a significantly lower survival compared to the wild-type mice. Dectin-3-deficient cells did not show significant difference in cytokine production, expression of co-stimulatory molecules, phagocytosis and fungicidal activity in relation to the control. Moreover, Dectin-3 knockout mice did not present greater mortality compared to wild type. Taken together, these results indicate that Dectin-2 – and not Dectin-3 – has an important role in inducing a protective immune response against *P. brasiliensis*.

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Pattern Recognition Receptors, Dectin-2, Dectin-3.

## 1. INTRODUÇÃO

---

"...E não há melhor resposta  
que o espetáculo da vida:  
vê-la desfiar seu fio,  
que também se chama vida,  
ver a fábrica que ela mesma,  
teimosamente, se fabrica,  
vê-la brotar como há pouco  
em nova vida explodida;  
mesmo quando é assim pequena  
a explosão, como a ocorrida;  
mesmo quando é uma explosão  
como a de há pouco, franzina;  
mesmo quando é a explosão  
de uma vida severina."  
(João Cabral de Melo Neto)

### 1.1 Paracoccidioidomicose e *Paracoccidioides* sp.

Existem, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies de fungos descritas no mundo e dessas, grande parte são comensais de animais e plantas. Estima-se que apenas 150 a 400 espécies podem infectar seres humanos, sendo algumas adaptadas a viverem nesses organismos, colonizando superfícies cutâneas e mucosas, sem necessariamente causarem doenças (HUBE, 2009). Ainda assim, infecções causadas por fungos, apesar de serem amplamente distribuídas ao redor do mundo e possuírem a capacidade de causar graves danos à saúde humana, não são devidamente reconhecidas em comparação com outros tipos de infecção (BROWN et al., 2012).

A maioria dos fungos que causam doenças são aqueles que vivem no meio ambiente, fora do organismo do hospedeiro, mas que, por algum motivo, e em algum momento, alcançam seus hospedeiros e causam uma infecção “acidental”. Possivelmente, esses fungos adquiriram um potencial patogênico em nichos ambientais que possuem semelhanças com aspectos do corpo humano, como temperatura e pH ideais (HUBE, 2009). Estima-se que a maioria das pessoas sofrerá de alguma micose superficial ao longo da vida, sendo geralmente de fácil tratamento. No entanto, milhões de indivíduos encontram-se em situações de vulnerabilidade e contrairão formas invasivas das infecções fúngicas, contraindo doenças graves, de difícil diagnóstico e tratamento (BRONW et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015).

Dentre as infecções fúngicas que merecem especial atenção, a paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* sp. e uma das micoses mais prevalentes da América Latina. É restrita a áreas subtropicais, desde o México até o norte da Argentina, com uma maior incidência, respectivamente, no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia e Argentina (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017;

TEIXEIRA et al., 2014). No Brasil, a doença apresentou a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (1,45 casos por um milhão de habitantes) e a oitava maior causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias em um período de 15 anos – 1980 a 1995 – (COUTINHO et al., 2002), constituindo, portanto, um sério problema social.

Entre janeiro de 1998 e dezembro de 2006, dados coletados de 13.682 pacientes hospitalizados com micoses sistêmicas mostraram que 49% das internações eram devido à PCM, com ênfases nas regiões norte e centro-oeste do Brasil (COUTINHO et al., 2015). Ainda que tais informações sejam notáveis, em 2008, a PCM foi incluída na lista de doenças tropicais negligenciadas cujo impacto na saúde pública é subnotificado devido à falta de dados disponíveis (HOTEZ, et al., 2008).

Historicamente, a primeira descrição da doença foi realizada no Brasil por Adolpho Lutz em 1908, após observar a natureza dimórfica do fungo em lesões de dois pacientes provenientes do estado de São Paulo. Mais tarde, em 1912, o fungo foi classificado como *Zymonema brasiliensis* por Afonso Splendore e, apenas em 1930, foi proposto o nome de *Paracoccidioides brasiliensis* por Floriano de Almeida (TEIXEIRA et al., 2013).

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Euromycetes, Ordem Onygenales e Família Ajellomycetaceae (Onygenaceae) (MARQUES, 2013). Esses organismos se adaptaram a dois nichos ecológicos distintos: o primeiro, em condições saprófitas, no solo e o segundo, em tecidos de hospedeiros (TEIXEIRA et al., 2014). Evidências epidemiológicas indicam que as formas saprófitas de *Paracoccidioides* spp. necessitam de condições específicas do solo, em lugares com fontes de água e vegetais (RESTREPO et al., 2001). Quanto a hospedeiros suscetíveis, além de seres humanos, o fungo já foi encontrado em diferentes espécies de mamíferos, como tatus, bichos preguiça e, até mesmo, em cachorros (BAGAGLI et al., 1998; DE FARIAS et al., 2011; TREJO-CHAVEZ et al., 2011).

Até o momento, duas espécies são reconhecidas por causar a doença: *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis* (TEIXEIRA et al., 2013), sendo a primeira formada por um único grupo monofilético encontrado no centro-oeste brasileiro e no Equador, e a segunda de, pelo menos, quatro espécies: S1 (subdividida em S1a e S1b), PS2, PS3 e PS4. No sudeste do Brasil são encontradas as espécies S1 e PS2, e no centro-oeste, a espécie S1. Já na Argentina é encontrada apenas a S1, na Colômbia, a PS3, e na Venezuela são encontradas as espécies PS2 e PS4 (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), como ilustrado na Figura 1. Apesar de serem conhecidas diferenças genéticas, morfológicas e epidemiológicas entre as duas espécies descritas, são necessários novos estudos relacionados à patogenicidade, para se buscar formas de tratamento mais específicas, uma vez que *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

poderiam induzir manifestações clínicas diversas, ter tropismo para diferentes órgãos e apresentarem diferentes susceptibilidades aos medicamentos indicados (MARQUES, 2013; TEIXEIRA et al., 2013).

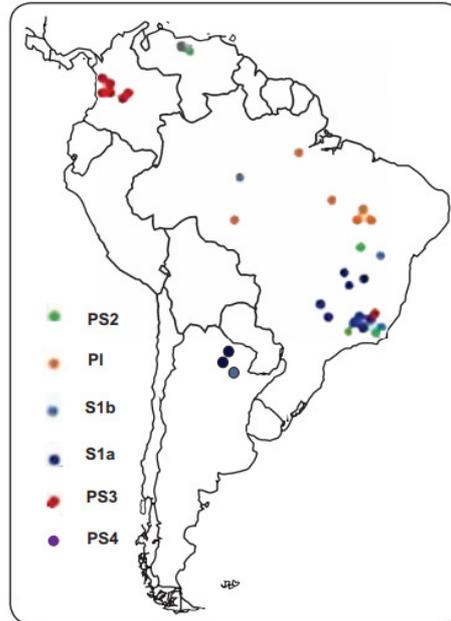


Figura 1. Distribuição geográfica do gênero *Paracoccidioides* sp. na América do Sul. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Por ser endêmica em populações rurais, a PCM afeta principalmente indivíduos cujo ofício envolve atividades agrícolas com manipulação do solo (TEIXEIRA et al., 2014). Seus agentes etiológicos são fungos termodimórficos que crescem na forma de micélio filamentosso saprofítico a temperaturas de 20 a 23°C. A partir do momento da inalação de propágulos aéreos – conídios –, com conseqüente migração para alvéolos pulmonares a 37°C, convertem-se para a forma de levedura (McEWEN et al., 1987; RESTREPO et al., 1986), tendo outros mamíferos

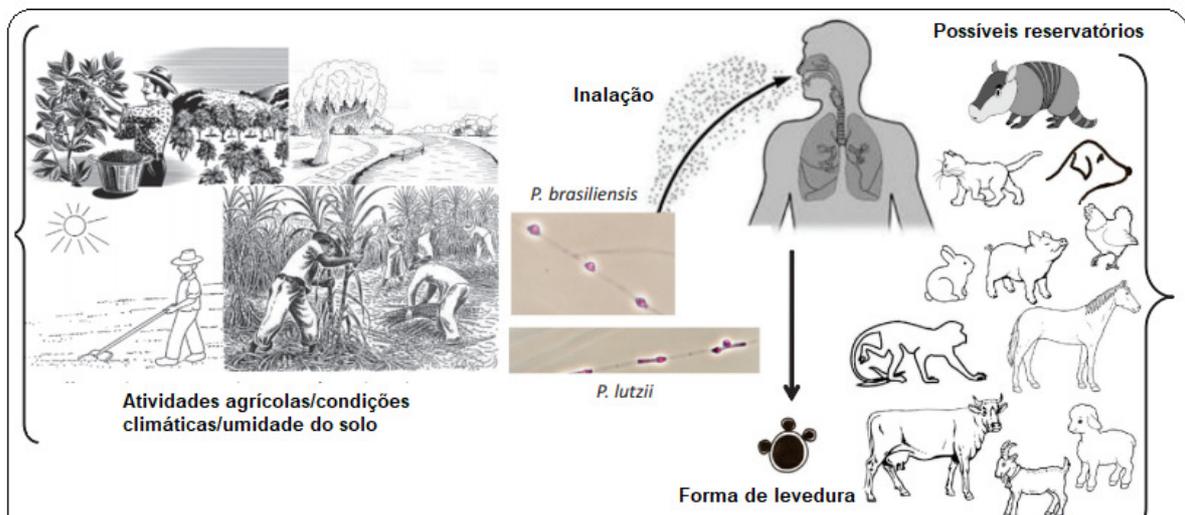


Figura 2. Propagação de *Paracoccidioides* spp. (Adaptado de SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

como possíveis reservatórios, (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), como ilustrado na Figura 2.

Na maioria dos casos, a infecção é adquirida nas primeiras duas décadas de vida. Entretanto, uma possível evolução da doença e manifestações clínicas distintas são mais comuns em idades posteriores, de 30 a 50 anos, devido a reativação de focos latentes (WANKE; LONDERO, 1994). Na infância, a infecção é estimada em 10% dos casos, sendo equitativamente distribuída entre os sexos. Na idade adulta, porém, a frequência de homens infectados pode ser de 10 a 15 vezes maior do que em mulheres (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), gerando uma discussão relacionada à interferência de hormônios femininos no ciclo de vida do fungo (ARISTIZABAL et al., 1998), já que o estrogênio está relacionado à redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias (STRAUB, 2007). Dessa forma, a presença do hormônio pode induzir a polarização de uma resposta do tipo Th2 (*T helper 2*) (CAIXETA et al., 2018) que, por sua vez, contribuiria para a cronicidade da doença (DE CASTRO et al., 2013). A maior frequência da infecção nos homens, todavia, pode estar também relacionada a fatores sociais, tendo em vista uma maior proporção de trabalhadores rurais do sexo masculino (TEIXEIRA et al., 2014).

Após a inalação dos conídios, os hospedeiros podem ou não desenvolver a PCM. Dessa forma, MARQUES (2013) sugeriu quatro classificações clínicas distintas para a doença:

1- Infecção: corresponde ao paciente que não possui qualquer sinal ou sintoma, porém, apresenta testes diagnósticos positivos.

2- Doença: pode ser dividida em dois grupos:

2.1. Forma aguda ou juvenil, que geralmente afeta pacientes até 30 anos de idade, podendo ser responsável pela manifestação de sinais clínicos graves e disseminação. No Brasil, é mais comum nos estados de Minas Gerais, Maranhão, Pará, São Paulo e Goiás (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

2.2. Forma crônica, podendo ser unifocal (atingindo um órgão ou sistema) ou multifocal, atingindo, em 90% dos casos, os pulmões. Inicia-se gradativamente e os sintomas podem persistir por meses ou anos. Pode ser classificada em benigna, moderada ou grave e, em alguns casos, a infecção só é detectada devido a exames médicos de rotina (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

3- Paracoccidiodomicose associada à imunossupressão. Em alguns casos, o fungo pode ser oportunista em pacientes com imunidade celular reduzida devido a doenças ou tratamentos imunossupressivos.

4- Sequelas da PCM: São manifestações clínicas de mudanças funcionais e anatômicas observadas depois do tratamento, podendo ser doenças obstrutivas pulmonares crônicas, estenose e obstrução das vias aéreas superiores e insuficiência adrenal.

Comorbidades – tuberculose, neoplasias e doenças imunossupressoras – e hábitos como o tabagismo e alcoolismo são relevantes para o seu prognóstico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). No entanto, já houve relatos de pacientes com nível nutricional adequado e baixa exposição a sítios de infecção com desenvolvimento de sintomas e progressiva evolução da PCM (MARTINEZ; MOYA, 2009), ilustrando a capacidade do fungo de causar a doença mesmo em indivíduos imunocompetentes. Dessa maneira, o sucesso da colonização do hospedeiro pelo fungo envolve mecanismos complexos, dependentes tanto de fatores de virulência do microrganismo, quanto da resposta imune desenvolvida pelo paciente (OLIVEIRA et al., 2015).

## **1.2 A resposta imunológica diante da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*.**

Após a migração da levedura para os alvéolos pulmonares, uma resposta imune inata é ativada. Tal resposta, a princípio, detecta a presença e a natureza da infecção e propicia a primeira linha de defesa do hospedeiro (MEDZHITOV, 2001). Inicialmente, é mediada por barreiras físicas, elementos químicos e células que atuam na tentativa de eliminação ou inibição do crescimento dos patógenos (BEUTLER, 2004). Uma vez nos pulmões, a infecção por *P. brasiliensis*, assim como outras infecções fúngicas, desencadeia a secreção de inúmeras proteínas antimicrobianas pelo epitélio pulmonar e o início de atividade fagocítica por macrófagos alveolares (CALICH et al., 2008).

Juntamente com os macrófagos residentes, células dendríticas do hospedeiro também exercem função efetora, que consiste na sua interação com o fungo pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes tanto em sua membrana plasmática, quanto no citoplasma (BROWN, 2011). A este respeito, é digno de nota reconhecer que os padrões moleculares evoluíram para exercer determinadas funções fisiológicas que são essenciais aos micro-organismos, e não para interagirem com o sistema imune do hospedeiro – como os fatores de virulência o são – . Nesse sentido, são evolutivamente conservados dentro das classes desses seres. Os PRRs, por sua vez, evoluíram para reconhecer PAMPs, sendo capazes de detectar a presença da infecção (MEDZHITOV, 2001).

Atualmente, são reconhecidos quatro grupos de PRRs, sendo eles: receptores do tipo Toll (TLR), do tipo NOD (*Nucleotide-binding and oligomerization domain*- NLR), RIG-I-like

(RLR) e Lectina do tipo C (CLR), sendo suas diferenças relacionadas: 1) ao reconhecimento de um ligante específico, 2) à via de transdução de sinal e 3) à localização celular (PLATO; HARDISON; BROWN, 2015). A interação de PRRs com PAMPs estimula uma cascata de eventos intracelulares que culminam em uma resposta inicial do hospedeiro ao microrganismo, induzindo diferentes respostas, como opsonização, ativação do sistema complemento, internalização do patógeno por fagócitos ativados, liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas líticas nos fagolisossomos, assim como secreção de citocinas e quimiocinas, que suscitam o influxo e ativação de células inflamatórias para o sítio de infecção e apoptose (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

No entanto, a importância desses receptores não se limita apenas a uma resposta imune inicial contra patógenos, mas também está relacionada à modulação da resposta imune adaptativa adequada aos diferentes micro-organismos. O reconhecimento de PAMPs pelos PRRs é capaz de induzir a ativação de fatores de transcrição, com consequente produção de citocinas, que ativam linfócitos TCD4<sup>+</sup> e polarizam o tipo de resposta necessária para a manutenção da homeostase do organismo (NETEA et al., 2008; PLATO; HARDISON; BROWN, 2015).

O balanço entre respostas imunes celulares e humorais é determinante para o resultado das infecções e, para que isso ocorra, determinadas subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> são ativadas. Tais subpopulações são classificadas de acordo com as citocinas que produzem, sendo primeiramente descritas as células Th1 e Th2 (MOSMANN et al., 1986). Principalmente, a presença de IL (*Interleucina*)-12 ativa a diferenciação de linfócitos Th1, com a ativação do fator de transcrição T-bet (*T box expressed in T cells*) e consequente produção de IFN- $\gamma$  (*Interferon gama*), IL-2 e TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alpha*) por essas células. Já as células Th2 se diferenciam na presença de IL-4, com a produção do fator de transcrição GATA-3 e produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (STEINMAN, 2017).

Atualmente são conhecidas outras subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, como as células T regulatórias (Tregs), Th17, entre outras, que estão também relacionadas à resposta imune induzida por *P. brasiliensis* (CASTRO et al., 2013). Células Th17 são diferenciadas na presença de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*), IL-6 e IL-23, com a ativação do fator de transcrição ROR $\gamma$ T (*Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*) e produzem IL-17, estimulando a acumulação de neutrófilos e células epiteliais, endoteliais e macrófagos a produzirem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de peptídeos antimicrobianos, as defensinas (STEINMAN, 2007). Células Tregs são diferenciadas na presença de TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*), expressam o fator de transcrição FoxP3

e produzem IL-10 e TGF- $\beta$ . Desta maneira, possuem conhecida atividade imunossupressiva, sendo responsáveis pela manutenção do equilíbrio, limitando respostas inflamatórias exacerbadas (SAKAGUCHI, 2000).

A resposta imune adaptativa conhecida por promover proteção contra infecções fúngicas é a do tipo Th1, particularmente naquelas sistêmicas, como as causadas por *C. neoformans* e *P. brasiliensis*, enquanto uma resposta Th17 já demonstrou ser protetora em modelos de candidíase (DAMBUZA; BROWN, 2015; DRUMMOND; LIONAKIS, 2016). Nesse sentido, a resistência de hospedeiros humanos e camundongos diante da infecção por *P. brasiliensis* mostrou ser dependente da ativação de fagócitos por linfócitos Th1, associada à produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (CALVI, et al., 2003; FORTES et al., 2011).

Em consequência, ocorre na PCM uma reação granulomatosa no tecido do hospedeiro, que possibilita uma forma eficiente e especializada de conter a multiplicação e disseminação fúngica pelo organismo (FORTES et al., 2011). Ademais, estudos recentes verificaram a importância de IL-6, IL-23 e IL-17 na formação de granulomas compactos, associados a uma maior produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , induzindo maior proteção contra o fungo. Dessa forma, tais resultados sugerem a relevância também de uma resposta imune Th17 na formação de granulomas e proteção contra a PCM experimental (TRISTÃO et al., 2017).

Em contraposição, a presença de células do tipo Th2 e Treg (com secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ ) foi relacionada a uma maior susceptibilidade à doença, com disseminação fúngica e maior mortalidade murina (BOCCA et al., 2013). No entanto, um considerável número de células Foxp3<sup>+</sup> foi observado em granulomas compactos de lesões mucosas, demonstrando que a modulação da resposta imune inflamatória por células Tregs é igualmente necessária para a proteção do hospedeiro (PAGLIARI et al., 2011).

Para sintetizar, DE CASTRO e colaboradores (2013) propuseram um modelo relacionando as diferentes manifestações clínicas da PCM com as respostas imunes correspondentes em humanos, de forma que, à medida em que a resposta imune celular vai diminuindo, a susceptibilidade à doença vai aumentando. E, da mesma forma, à medida em que a resposta imune humoral aumenta, a resistência à infecção diminui.

Essencialmente, a infecção – manifestação clínica assintomática – é caracterizada por um tipo de resposta predominante Th1, com a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com consequente ativação de macrófagos e eliminação do fungo. Já na forma aguda da doença, ocorre a ativação de uma resposta Th2 (com produção de IL-4 e IL-5) e Th9 (produção de IL-9 e IL-21), induzindo uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos IgG4 (*Imunoglobulin G4*) e IgE. Esse tipo de resposta induz a ativação de eosinófilos, devido à presença de IL-5 e a

inibição de macrófagos, devido à presença de IL-4, acarretando uma maior susceptibilidade ao hospedeiro (DE CASTRO et al., 2013).

A forma crônica da PCM é induzida por uma resposta complexa, com a combinação de respostas Th17 e Th22 associadas às respostas Th1 e Th2/Th9, o que geraria uma resistência parcial à infecção e, ao mesmo tempo, poderia induzir uma resposta imune exacerbada, com ativação de neutrófilos e danos teciduais, com posterior fibrose. Simultaneamente, a presença de células Tregs poderia controlar a resposta inflamatória e inibir a ativação de macrófagos (DE CASTRO et al., 2013).

À vista da importância de uma resposta imune inata adequada para suscitar a resposta adaptativa protetora, os mecanismos de ação induzidos pela interação de TLRs e CLRs com a parede celular de fungos são extensivamente estudados na infecção por *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *P. brasiliensis*, entre outros (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014; GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009; NETEA et al., 2004). E, apesar da evidente relevância desses PRRs no reconhecimento fúngico, o estudo da interação de PAMPs e DAMPs (*Padrões moleculares associados a danos*) com os receptores localizados no citoplasma da célula do hospedeiro, como os NLRs, está se tornando cada vez mais promissor (TAVARES et al., 2015).

### 1.3 Receptores do tipo NOD (NLRs)

Os receptores NLRs se diferenciam dos demais devido à sua localização, pois são encontrados no citoplasma das células efectoras. Além disso, são capazes de se associarem à proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase activation and recruitment domain* (CARD)) e à procaspase-1 para formar um complexo multiproteico chamado inflamassoma (STROWIG et al., 2012).

Dentre os diversos tipos de inflamassomas conhecidos, o mais estudado no reconhecimento de padrões moleculares dos fungos é o inflamassoma NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*), sendo necessários dois sinais para a sua ativação: o reconhecimento de PAMPs e DAMPs (MARTINON et al., 2009).

O primeiro sinal (reconhecimento de um PAMP) induz a transcrição da molécula pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, via ativação de NF- $\kappa$ B (MARTINON et al., 2009). O segundo sinal de ativação do inflamassoma NLRP3 pode ser a presença de ATP extracelular, produção de ROS e efluxo de íons através da membrana plasmática, induzindo a ativação da caspase-1 e consequente quebra de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas ativas (IL-1 $\beta$  e IL-18) (MARTINON et al., 2009).

Essas citocinas pró-inflamatórias tem o papel de induzir uma resposta imune adaptativa do tipo Th1/Th17, sendo essenciais para o controle de diversos micro-organismos, incluindo bactérias, vírus e fungos (GROSS et al., 2009). TAVARES e colaboradores (2013) demonstraram a importância da ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que, nas células dendríticas murinas, esse complexo é ativado pelo reconhecimento do PAMP e pelo efluxo de potássio ( $K^+$ ), produção de ROS, acidificação do lisossomo e presença de catepsina B, para o processamento e liberação de IL-1 $\beta$ . Além disso, essa citocina se mostrou necessária para a ativação da capacidade fungicida de macrófagos, comprovando a relevância do inflamassoma NLRP3 no controle da PCM.

#### 1.4 Receptores do tipo Toll (TLRs)

Os primeiros PRRs a serem identificados são expressos tanto em células da resposta imune – como células dendríticas e macrófagos – como em fibroblastos e células epiteliais. São receptores transmembrana do tipo I, caracterizados por um domínio extracelular com repetições rico em leucina (LRR), responsável pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs e um domínio citoplasmático “TIR” (*receptor Toll/IL-1*), que inicia a sinalização intracelular (BOTOS et al., 2001; MEDZHITOV, 2001).

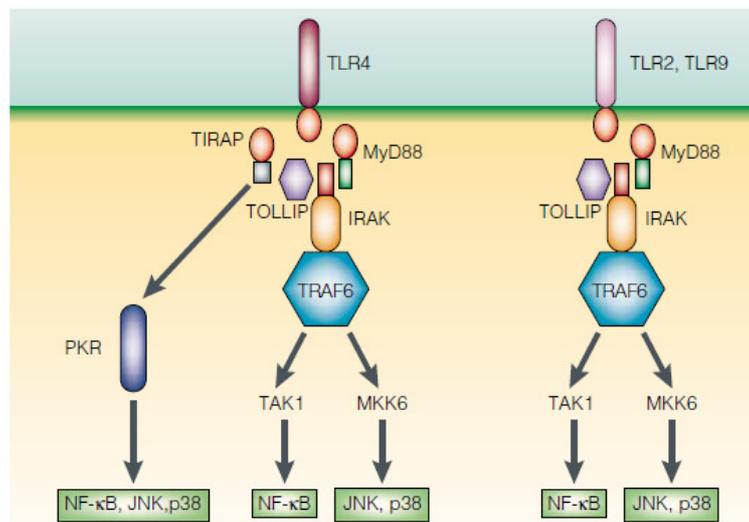
Existem dez tipos TLRs em humanos (TLR1-TLR10) e doze em camundongos (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13), sendo divididos em receptores localizados na superfície celular ou em compartimentos intracelulares, como retículos endoplasmáticos e lisossomos. Devido a sua localização, podem reconhecer uma variedade de PAMPs, como lipídios, lipoproteínas, peptidoglicanos, ácidos nucleicos, entre outros (KAWASAKI; KAWAI, 2014).

Na superfície celular são encontrados TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10, que reconhecem lipopolissacarídeos (LPS), como o TLR4, lipoproteínas, peptidoglicanas, ácidos lipoteicóicos, zymosan, mananas (TLR2, TLR1, TLR6), flagelina bacteriana (TLR5), vírus da Influenza A (TLR10), entre outros (KAWAI; AKIRA, 2010). Em compartimentos intracelulares são encontrados TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13, que reconhecem ácidos nucleicos derivados de micro-organismos, além de ácidos nucleicos próprios, em condições de autoimunidade (BLASIUS; BEUTLER, 2010). Desse modo, a localização do receptor e o tipo celular são importantes também na regulação do sinal e determinam respostas imunes particulares aos micro-organismos correspondentes (KAWASAKI; KAWAI, 2014).

Após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, a transdução de sinal leva a ativação de genes que relacionados com a defesa do hospedeiro, como a produção de citocinas

inflamatórias, quimiocinas, Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), moléculas coestimulatórias e moléculas efetoras, como peptídeos antimicrobianos (MEDZHITOV, 2001).

A sinalização intracelular que parece ser compartilhada por todos os TLRs e receptores de IL-1 (*IL-1R*) incluem quatro componentes essenciais: as proteínas adaptadoras MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*) e TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) ou TOLLIP (*Toll-Interacting Protein*), uma proteína quinase IRAK (*IL-1R-associated kinase*) e outra proteína adaptadora TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) (MEDZHITOV, 2001). O domínio citoplasmático TIR dos TLRs recruta as proteínas adaptadoras MyD88 e TRIF que, por sua vez, recrutam IRAK. IRAK é autofosforilada e se associa com TRAF6, que induz a ativação de TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase*) e MKK6 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 6*). Em resposta, essas moléculas ativam NF- $\kappa$ B (*Factor nuclear kappa B*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e p38 MAP quinase, respectivamente. A sinalização via TLR4 pode ser também independente de MyD88, sendo recrutada a proteína quinase PKR, como evidenciado na Figura 3 (CAO et al., 1996; MEDZHITOV, 2001; WANG et al., 2001).



**Figura 3. Sinalização intracelular mediada por TLRs (Adaptado de MEDZHITOV, 2001).**

No contexto de infecções fúngicas, é difícil definir quais PAMPs seriam necessários para a indução das respostas imunes via TLR, devido à plasticidade da parede celular desses micro-organismos (BOURGEOIS; KUCHLER, 2012). Alguns estudos demonstraram a importância de TLR2 – associado a Dectina-1 – no reconhecimento de  $\beta$ -glucanas de *C. albicans* (NETEA et al., 2006). Ademais, esse receptor também é estimulado por ligantes presentes em conídios e hifas de *A. fumigatus* (NETEA et al., 2003). Heterodímeros

TLR2/TLR1 e TLR2/TLR6 reconhecem a glucuronoxylomannana (GXM) da cápsula de *C. neoformans* (FONSECA et al., 2010).

Adicionalmente, NAKAIRA-TAKAHAGI e colaboradores (2011) demonstraram que o antígeno gp43 de *P. brasiliensis* é capaz de se ligar em TLR2, TLR4 e receptores de manose expressos em monócitos, demonstrando a relevância desses receptores na infecção pelo fungo. No estudo citado, a produção de TNF- $\alpha$  pelas células ativadas foi devida à interação de *P. brasiliensis* com TLR4 e receptores de manose, enquanto IL-10 foi produzida após interação do fungo com TLR2 na superfície celular. Em neutrófilos humanos, no entanto, tais receptores não pareceram possuir um papel relevante em se tratando de sua atividade fungicida (ACORCI-VALÉRIO et al., 2010)

De maneira interessante, a interação de *P. brasiliensis* com alguns TLRs parece ser um importante mecanismo de escape do fungo. Segundo CALICH e colaboradores (2008), as leveduras são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos a partir de sua interação com TLR2 e TLR4. No entanto, tal interação não é capaz de controlar a infecção, o que permite a multiplicação fúngica. A ligação com TLR3 também parece ser favorável para o fungo, uma vez que macrófagos infectados deficientes do receptor apresentaram maior capacidade fungicida comparados com aqueles selvagens. Além disso, animais knockouts apresentaram menor quantidade de leveduras recuperadas do pulmão após 30 dias de infecção (JANNUZZI et al., 2019).

Embora haja estudos relacionando o reconhecimento de certos fungos por TLR2/1, TLR4, TLR3, TLR2/6, TLR7 e TLR9, tais receptores não são os principais agentes responsáveis pela indução de uma resposta imune inata efetora (BOURGEOIS; KUCHLER, 2012; HARDISON; BROWN, 2012). E apesar de sua relevância no reconhecimento fúngico já ser estabelecida em modelos murinos, indivíduos imunocompetentes que não possuem MyD88 – e outras moléculas da sinalização intracelular mediada por TLRs –, parecem não possuir uma maior predisposição para doenças fúngicas. Ademais, a interação de TLRs com outros PRRs demonstrou ser essencial para tal imunidade (HARDISON; BROWN, 2012).

Em contraste, levando em consideração a abundante presença de carboidratos na parede celular de fungos (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014), os receptores CLR – e moléculas intracelulares relacionadas – são essenciais para o reconhecimento e indução de uma resposta imune antifúngica adequada (HARDISON; BROWN, 2012). Em conformidade, há estudos que relacionam o envolvimento desses receptores na modulação da sinalização de TLRs e na indução da expressão de genes específicos diante da infecção por esses patógenos (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009).

### 1.5 Receptores Lectinas do tipo C – CLR<sub>s</sub>

São receptores transmembranas principalmente expressos em células mielóides, podendo ser encontrados também em linfócitos, granulócitos, osteoclastos e células epiteliais (PLATO; HARDISON; BROWN, 2015). O termo “Lectina do tipo C” foi primeiramente usado para distinguir sua ligação em carboidratos que, em sua maioria, é dependente de  $Ca^{+2}$  (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). Tal ligação se dá a partir de um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs). No entanto, com base em estudos moleculares, observou-se que nem todas as proteínas que contêm CRDs do tipo C se ligam a carboidratos ou são dependentes de  $Ca^{+2}$ . Dessa forma, um novo termo – CTLD (*C-type lectin-like domains*) – foi introduzido para se referir a tais domínios (ZELENSKY; GREADY, 2005).

São divididos em 17 grupos, de acordo com sua filogenia e estrutura (ZELENSKY; GREADY, 2005), no entanto, os mais estudados no reconhecimento de micro-organismos são os grupos II (receptores  $Ca^{+2}$  dependentes com um único CRD), V (receptores  $Ca^{+2}$  independentes, com um único CTLDs) e VI (receptores  $Ca^{+2}$  dependentes com múltiplos CRDs) (HOVING; WILSON; BROWN, 2014).

O reconhecimento do PAMP se dá por meio de motivos conservados presentes no domínio CTLD, como o motivo EPN (Glu-Pro-Asn) – responsável pela ligação à manose, N-acetilglucosamina, L-fucose e glicose – e o motivo QPD (Gln-Pro-Asp) – que reconhece galactose e N-acetilgalactosamina –. Além disso, também podem se ligar a carboidratos como  $\beta$ -glucanas e a outras biomoléculas, como lipídios e proteínas (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014).

CLR<sub>s</sub> reconhecem ligantes endógenos e exógenos para a manutenção da homeostase do organismo, podendo ser eles PAMPs, DAMPs ou TAMPs (*Padrões moleculares associados a tumores*). Além disso, são os principais receptores no reconhecimento de fungos (HARDISON; BROWN, 2013). A partir desse reconhecimento, a transdução do sinal se dá de forma dependente ou independentemente da quinase Syk (*Spleen tyrosine kinase*) (DAMBUZA; BROWN, 2015).

De acordo com SANCHO E SOUZA (2012), os CLR<sub>s</sub> podem ser divididos em três grupos, baseados em seus motivos citoplasmáticos e potencial de sinalização intracelular:

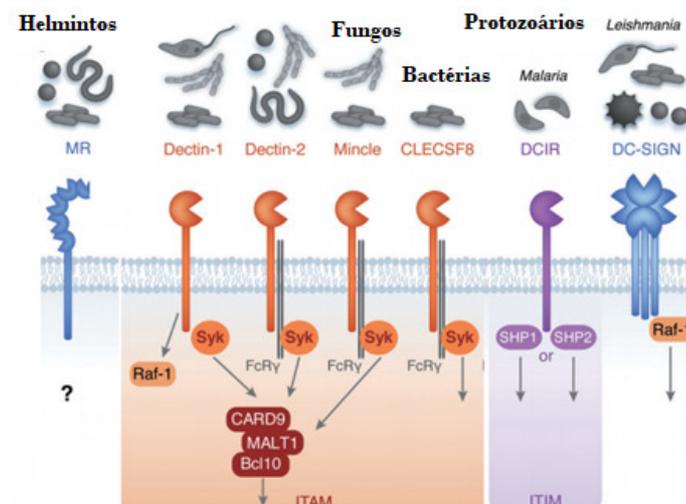
1- CLR<sub>s</sub> dependentes de SyK, com motivos ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*: sequências de YxxI/L, onde x designa qualquer aminoácido) em sua cauda citoplasmática – como Dectina-1 – ou associados a uma cadeia adaptadora, como, por exemplo,

FcR $\gamma$  (*Fc receptor gamma*) – Dectina-2, Dectina-3 e Mincle –, levando a ativação de fatores de transcrição.

2- CLR dependentes de SyK com motivos ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) – como MICTL e DCIR –, que regulam a ativação de outras vias intracelulares.

3- CLR que não utilizam a fosforilação de motivos ITAM ou ITIM na sua cascata de sinalização intracelular – como receptor de manose (MR) e DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*). Tais receptores possuem atividade endocítica, podendo mediar a captura de micro-organismos e apresentação antigênica às células T. No entanto, seu estímulo isoladamente não induz sinais de ativação celular, apesar de, em alguns casos, modular a resposta de outros receptores.

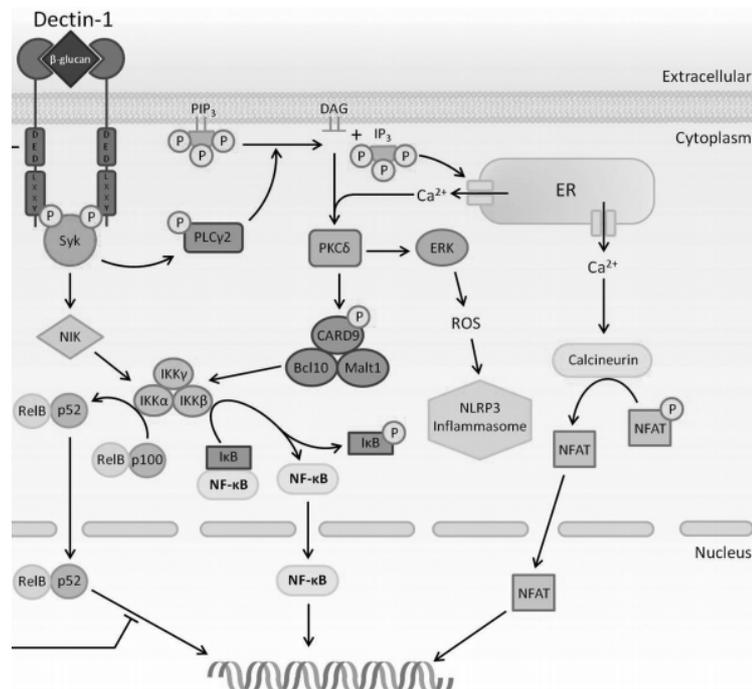
A Figura 4 mostra uma representação esquemática dos CLR citados, os seres que possuem seus ligantes – bactérias, fungos, protozoários e helmintos – e um resumo de suas vias de ativação, explicadas adiante.



**Figura 4.** Representação esquemática dos receptores de Lectina do tipo C, seus respectivos ligantes e vias de ativação dependentes ou independentes de SyK (Adaptado de HOVING; WILSON; BROWN, 2014).

Canonicamente, SyK fosforila ITAM na cauda citoplasmática do próprio receptor ou associados a uma cadeia adaptadora. Uma via conhecida de ativação dos fatores de transcrição NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) e NF- $\kappa$ B por CLR, com consequente produção de citocinas e quimiocinas, envolve a via da quinase PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) e DAG (*Diacylglycerol*) (PLATO; HARDISON; BROWN, 2015), mostrada na Figura 5, que exemplifica uma via de transdução de sinal gerada a partir da ligação de  $\beta$ -glucana com Dectina-1.

A ativação da fosfolipase PLC $\gamma$ 2, dependente de SyK, leva à liberação de íons Ca<sup>+2</sup> e ativação de várias proteínas quinases C (PKC). A PKC $\delta$  ativa as vias de calcineurina/NFAT e ROS/ inflamassoma NLRP3, além de fosforilar CARD9, a qual forma um complexo trimérico com Bcl-10 e Malt1, responsável por ativar NF- $\kappa$ B. O complexo CARD9/Bcl-10/Malt1 pode ativar todas as subunidades de NF- $\kappa$ B, incluindo c-Rel, removendo seu inibidor (I $\kappa$ B) pela ativação do complexo IKK. SyK também pode ativar o complexo IKK por meio da via NIK, levando à ativação das subunidades RelB e p52 de NF- $\kappa$ B (PLATO; WILLMENT; BROWN, 2013).



**Figura 5** Representação esquemática da via de sinalização de Dectina-1 a partir da ligação com  $\beta$ -glucana (Adaptado de PLATO; WILLMENT; BROWN, 2013).

Alguns CLRs, no entanto, também podem desempenhar função inibidora, por conter em sua cauda citoplasmática o motivo ITIM. A fosforilação de ITIM envolve o recrutamento de tirosinas fosfatases, que promovem efeitos reguladores em outras vias de ativação, sendo importantes na inibição de doenças autoimunes (PLATO; HARDISON; BROWN, 2015).

Até o momento, dentre esses receptores, Dectina-1, Dectina-2, Dectina-3, Mincle, MR e DC-SIGN são reconhecidos por sua habilidade de se ligarem à parede celular de fungos, induzindo uma resposta imunológica protetora (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014; HARDISON; BROWN, 2012). Enquanto Dectina-1 reconhece  $\beta$ -glucanas, os outros receptores se ligam a estruturas baseadas em manose encontradas na camada de mananas da parede celular dos fungos, com exceção de Dectina-3. As respostas desencadeadas por esses receptores

incluem fagocitose, indução de mecanismos antifúngicos e produção de mediadores solúveis, quimiocinas e citocinas, além de reconhecidas e modular o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas, notadamente Th1 e Th17 (HARDISON; BROWN, 2012).

### 1.5.1 Dectina-1

Também conhecida como CLEC7A, é expressa em células mielóides, incluindo células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos  $T\gamma\delta$  e, em humanos, ainda pode ser expressa em linfócitos B, eosinófilos e mastócitos (SANCHO; SOUZA, 2012). Possui um único domínio CTLD extracelular que reconhece  $\beta$ -1,3 glucana, presente na parede celular de fungos, algumas bactérias e plantas (BROWN, 2011; PALMA et al., 2006). Dectina-1 não possui um domínio CRD característico, ligando-se à  $\beta$ -glucana de forma independente de  $Ca^{+2}$  (SANCHO; SOUZA, 2012).

O receptor é capaz de recrutar e ativar SyK, fosforilando ITAM, diretamente após ligação com  $\beta$ -1,3 glucanas. No entanto, a cauda citoplasmática de Dectina-1 possui apenas uma tirosina dentro do motivo YxxL, sendo designada “hemITAM” (SANCHO; SOUZA, 2012). Além da via canônica Syk -PLC $\gamma$ 2-CARD9/Bcl10/Malt1, o receptor pode ativar fatores de transcrição por meio de outras vias, como, por exemplo, a via da quinase Raf-1, independentemente de SyK (HARDISON; BROWN, 2012).

$\beta$ -glucanas solúveis possuem alta afinidade com Dectina-1, no entanto, agem como antagonistas da ativação induzida por  $\beta$ -glucanas particuladas. A ativação do receptor requer seu próprio agrupamento a partir da presença de partículas de  $\beta$ -glucanas e a exclusão das tirosinas fosfatases CD45 e CD148 (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014). Essas, por sua vez, promovem a remoção de fosfotirosinas inibidoras da via de ativação dependente de SyK. Contudo, elas devem ser excluídas da “sinapse” de sinalização para que a fosforilação de ITAM possa ocorrer (GOODRIDGE et al., 2011).

A indução das vias leva à produção de citocinas e quimiocinas, como IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , MIP-2, pró-IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-6, IL-10 e GM-CSF, além de ácido araquidônico e prostaglandinas (BROWN, 2011). Tais citocinas ainda estimulam a ativação de linfócitos TCD4 $^{+}$ , TCD8 $^{+}$  e linfócitos B, com consequente produção de anticorpos (SANCHO; SOUZA, 2012). Ademais, Dectina-1 também induz a fagocitose, produção ROS e ativação do inflamassoma NLRP3, com posterior liberação de IL-1 $\beta$  ativa (PLATO; HARDISON; BROWN, 2015).

Em seres humanos, uma mutação no gene Y238X acarreta deficiência na expressão do receptor nas membranas celulares, o que ocasiona susceptibilidade do hospedeiro à candidíase

vulvovaginal e mucocutânea (BROWN, 2011). Dessa forma, o papel fundamental de Dectina-1 na resposta imune em face das infecções fúngicas causadas por *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Trichophyton rubrum*, entre outros, tem sido extensivamente estudado (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014; DAMBUZA; BROWN, 2015).

No contexto de infecção por *P. brasiliensis*, estudos demonstraram a importância do receptor na indução tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Dectina-1 associado a TLR-2 e TLR-4 em monócitos e neutrófilos humanos induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras para o controle da infecção (BONFIM et al., 2009). Ademais, o reconhecimento de *P. brasiliensis* por Dectina-1 em neutrófilos (PMNs) humanos ativados mostrou-se necessário para a liberação de “redes extracelulares” (NETs- *Neutrophil extracellular traps*) por essas células, retratando seu importante papel também na morte extracelular do fungo (BACHIEGA et al, 2016). Em camundongos, o receptor induz ainda a polarização da resposta de macrófagos M1 e a expansão de células CD8+ IL-17+ na PCM. A sua ausência possibilita um aumento de células T reguladoras no sítio de infecção, proporcionando uma maior vulnerabilidade dos animais (LOURES et al., 2014).

### **1.5.2 Receptor de Manose (MR)/CD206**

É encontrado principalmente em macrófagos, mas também em células dendríticas derivadas de monócitos e algumas células não imunes, como as epiteliais. Contém 8 CRDs que se ligam a manose, fucose e N-acetilglucosamina, reconhecendo, dessa forma, muitos micro-organismos e moléculas próprias (KERRIGAN; BROWN, 2009).

Estudos relacionados à resposta imune a fungos mostraram que MR está envolvido na fagocitose de *Pneumocystis* sp. por macrófagos alveolares (ZHANG et al., 2005), atestando sua importância nesse mecanismo efetor. No entanto, isso só acontece quando o receptor é expresso em células fagocíticas. Desse modo, MR não parece ser o principal responsável pela fagocitose em células dendríticas e macrófagos, mas facilita o processo em colaboração com outros receptores, como DC-SIGN (SANCHO; SOUZA, 2012).

LOURES e colaboradores (2015) evidenciaram a importância desse receptor na indução da proliferação de linfócitos Th17/Tc17, agindo sinergicamente com TLR-4 e Dectina-1 no contexto da infecção por *P. brasiliensis*.

### 1.5.3 DC-SIGN

Expresso principalmente em células dendríticas, seu CRD único tem um motivo EPN altamente conservado, que se liga a manose e fucose (GEIJTENBEEK et al., 2009), sendo relevante seu papel no reconhecimento de inúmeros micro-organismos, alérgenos e moléculas próprias (SANCHO; SOUZA, 2012). Possui papel importante na endocitose e fagocitose, induzindo a apresentação antigênica pela célula (ENGERING et al., 2002). Contudo, não ativa NF- $\kappa$ B de forma isolada, sendo necessário estar associado a outro receptor, TLRs, para induzir a produção de citocinas, como a IL-10 (GRINGHUIS et al., 2007).

DC-SIGN pode ainda ser importante na resposta imune a *P. brasiliensis*, uma vez que vesículas extracelulares liberadas pelo micro-organismo transportam polissacarídeos em sua superfície e expõem ligantes para o receptor (DA SILVA et al., 2015).

### 1.5.4 Dectina-2

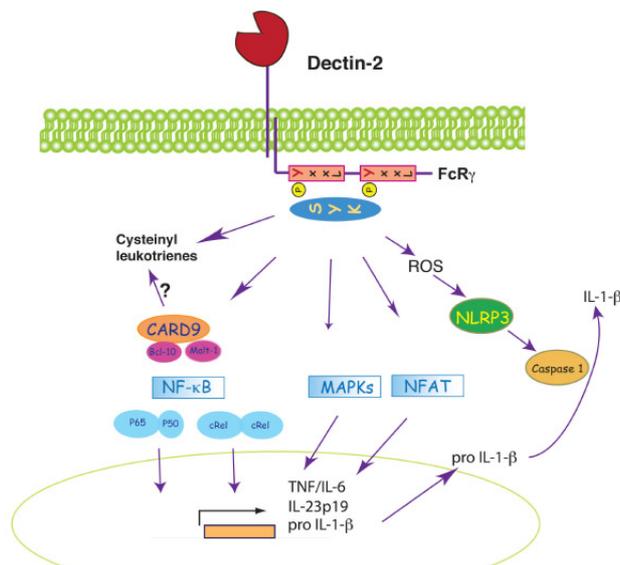
É uma proteína transmembrana do tipo II com um domínio CLTD e uma cauda citoplasmática curta (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014). Sua presença foi detectada primeiramente em células de Langerhans, sendo encontrada posteriormente em macrófagos, neutrófilos, variedades de células dendríticas, incluindo as plasmocitóides, monócitos e linfócitos. Como outros membros de sua família, sua cauda citoplasmática se associa com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$ , que contém motivos ITAM, para a transdução do sinal (KERSCHER; WILLMENT; BROWN, 2013).

O receptor contém o motivo EPN no seu domínio CRD extracelular, que se liga a manose, glucose/N-acetilglucosamina e fucose de forma dependente de Ca<sup>+2</sup>. Dectina-2 se liga a manoses de alto peso molecular, especialmente  $\alpha$ -mananas, encontradas em diferentes espécies, como bactérias, fungos (incluindo *P. brasiliensis*), helmintos, artrópodes e mamíferos (McGREAL et al., 2006). Dessa maneira, o receptor já foi estudado no reconhecimento de *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *C. neoformans*, *T. rubrum*, *Malassezia* spp., *A. fumigatus*, *Mycobacterium* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Schistosoma mansoni*, espécies de ácaros domiciliares e, até mesmo do vírus Ebola, cujo envelope viral contém polissacarídeos de manose de alto peso molecular (YABE; SAIJO, 2016).

Após reconhecimento do ligante, a sinalização intracelular se dá via recrutamento de Syk, PKC $\delta$  e ativação do complexo CARD9-Bcl10-Malt1, com consequente ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e produção de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10, IL-23, pró-IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 (YABE; SAIJO, 2016). A sinalização por meio de Dectina-2 pode envolver também a fosfolipase C $\gamma$ 2 e proteínas quinases MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), com ativação

seletiva da subunidade c-Rel de NF- $\kappa$ B, via Malt1, induzindo a produção de IL-23 e pró-IL-1 $\beta$ , como exemplificado na Figura 6. A ligação com o PAMP induz ainda a produção de ROS e ativação do inflamassoma NLRP3 para a secreção de IL-1 $\beta$  ativa (KERSCHER; WILLMENT; BROWN, 2013).

Posto isso, Dectina-2 está relacionada com a indução de respostas do tipo Th1 e Th17, promovendo proteção contra diversos micro-organismos, principalmente fungos (PLATO; HARDISON; BROWN, 2015; SANCHO; SOUZA, 2012). Ademais, o receptor também é reconhecido por induzir a produção de eicosanoides, leucotrienos e citocinas relacionadas a um perfil Th2 de resposta, importante em processos alérgicos e nas infecções por ácaros e helmintos, o que sugere possuir ampla variedade de funções (KERSCHER; WILLMENT; BROWN, 2013).



**Figura 6.** Representação esquemática das vias de sinalização de Dectina-2 com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$  (SANCHO; SOUZA, 2012).

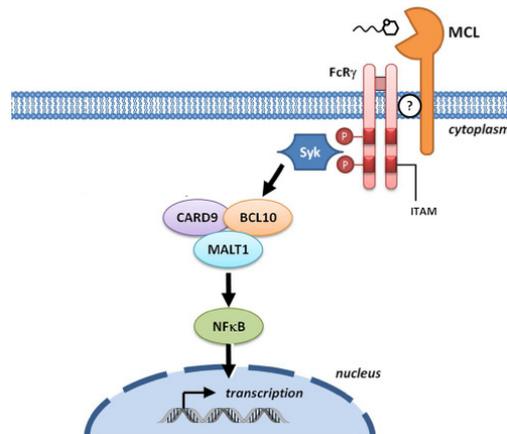
Estudos recentes revelaram que Dectina-2, juntamente com Dectina-3, possui um papel no reconhecimento de *P. brasiliensis* em células plasmocitóides humanas, confirmando a importância de CLRs dependentes de SyK na indução de resposta protetora contra o fungo (PREITE et al., 2018). De modo interessante, em alguns casos, o engajamento simultâneo de Dectina-2 com outros PRRs demonstra ser necessário para a indução de resposta imunológica. Nesse sentido, o receptor pode formar um heterodímero com Dectina-3 para o reconhecimento de  $\alpha$ -mananas em hifas de *C. albicans*, levando a uma ampliação da resposta protetora no hospedeiro (ZHU et al., 2013).

### 1.5.5 Dectina-3 e Mincle (Macrophage inducible C-type lectin),

Também conhecida como CLECSF8, CLEC4D e MCL, Dectina-3 pertence à família de CLRs de Dectina-2, possuindo um único domínio CTLD, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática curta, sem o domínio de ITAM (KERSCHER et al., 2016). Sua presença foi primeiramente identificada em macrófagos humanos e murinos, sendo posteriormente descrita em neutrófilos, monócitos e células dendríticas (KERSCHER; WILLMENT; BROWN, 2013). No entanto, pouco se conhecia sobre seus ligantes e vias de sinalização, uma vez que o receptor não compartilha os motivos EPN de sua família, responsáveis pela ligação aos carboidratos (SANCHO; SOUZA, 2012).

Estudos pioneiros, a princípio, não obtiveram êxito na identificação da cadeia adaptadora associada ao receptor – responsável por ativar as vias de sinalização –, devido à falta de resíduos de aminoácidos positivamente carregados dentro ou próximo de seu domínio transmembrana (GRAHAM et al., 2012). Posteriormente, o glicolipídio da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* –TDM (*Trehalose-6,6'-dimycolate*) – foi identificado como sendo um ligante de Dectina-3; e a via de sinalização intracelular desencadeada a partir de sua ligação foi finalmente associada a FcR $\gamma$ . Porém, ainda não está esclarecida a maneira pela qual ocorre essa associação (MIYAKE et al., 2013).

A partir da ligação com o PAMP, a via de sinalização é similar à da Dectina-2, por meio da ativação de SyK e do complexo CARD9-Bcl10-Malt1 (GRAHAM et al., 2012; WILSON et al., 2015), como demonstrado na Figura 7. Sua ativação pode induzir a fagocitose, produção de ROS e citocinas pró-inflamatórias (KERSCHER; WILLMENT; BROWN, 2013). Entretanto, ainda que Dectina-3 pareça desempenhar um papel importante na indução de resposta imune por si só, ela apresenta a capacidade de regular a expressão de outros PRRs, como o Mincle, e de formar heterodímeros que amplificam ainda mais essa resposta (MIYAKE; OH-HORA; YAMASAKI, 2015; ZHU et al., 2013).



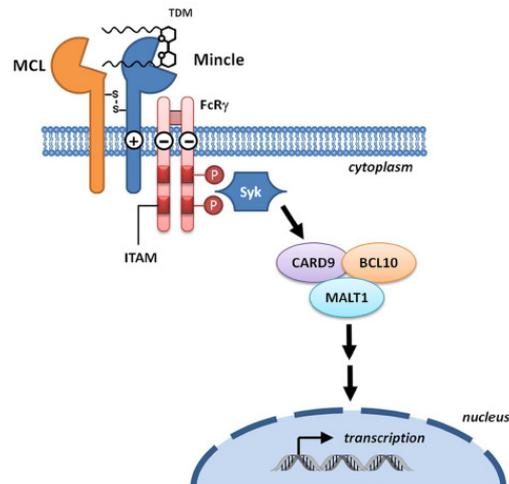
**Figura 7.** Representação esquemática da via de sinalização de Dectina-3 com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$ , a partir de sua ligação com TDM (adaptado de RICHARDSON; WILLIAMS, 2014).

Mincle, por sua vez, reconhece células danificadas e é pouco expresso em macrófagos e neutrófilos não expostos a citocinas pró-inflamatórias ou a agonistas de TLRs. E, para se associar à cadeia FcR $\gamma$  e induzir uma cascata de sinalização intracelular via SyK, o receptor possui um resíduo de arginina na sua porção transmembrana (YAMASAKI et al., 2008). Quando macrófagos são estimulados com TDM, a ativação de Mincle leva a indução de NF- $\kappa$ B, via CARD9, e resulta na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como CXCL2, CXCL1, TNF- $\alpha$ , e IL-6, assim como na produção de NO (*Óxido Nítrico*) (ISHIKAWA et al., 2009). Em conformidade, o receptor é necessário para a geração de uma resposta imune do tipo Th1/Th17 em vacinas que contêm um análogo sintético de TDM (Trehalose dibehenate) como adjuvante (SCHOENEN et al., 2010).

Dectina-3 é vinculado ao Mincle, regulando sua expressão e sinalização em modelos de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (MIYAKE; OH-HORA; YAMASAKI, 2015; WILSON et al., 2015). Além disso, a presença de Dectina-3 também se mostrou relevante na indução da resposta imune diante de infecções por *Klebsiella pneumonia* e *Mycobacterium bovis*, sendo sua expressão estreitamente correlacionada à expressão de Mincle (KERSCHER et al., 2016; STEICHEN et al., 2013).

Dectina-3 ainda pode formar heterodímeros com Dectina-2 e Mincle para indução de resposta imune diante de infecções fúngicas e bacterianas. Heterodímeros de Dectina-3 e Mincle tem a capacidade de se ligar a TDM, como demonstrado na Figura 8, de forma que Mincle reconhece a porção glicídica da molécula e Dectina-3, sua cauda lipídica. Dessa forma, Mincle atua como uma ponte entre Dectina-3 e a molécula adaptadora FcR $\gamma$  para a transdução de sinal (RICHARDSON; WILLIAMS, 2014).

Em modelos de infecção por fungos, ZHU e colaboradores (2013) constataram que heterodímeros de Dectina-2 e 3 se ligam a  $\alpha$ -mananas, encontradas em hifas de *C. albicans*, de forma mais eficaz, induzindo uma resposta inflamatória potencializada em comparação com as respostas induzidas pelos receptores de forma individual.



**Figura 8.** Representação esquemática da via de sinalização do heterodímero de Dectina-3 e Mincle com a cadeia adaptadora FcR $\gamma$  a partir de sua ligação com a molécula TDM (adaptado de RICHARDSON; WILLIAMS, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

*“Mesmo sem querer fala em verso,  
Quem fala a partir da emoção”  
(João Cabral de Melo Neto)*

Infecções por fungos têm crescido significativamente nas últimas décadas devido a vários fatores, que englobam desde mudanças ambientais e sociais, ao surgimento de doenças que comprometem o devido funcionamento do sistema imune, como a AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*). Ademais, avanços na medicina que gerariam intervenções médicas invasivas, hospitalizações prolongadas e tratamentos que induzem uma imunossupressão, como em transplantes e quimioterapias, também colaboram para o aumento da incidência de tais infecções. Em contrapartida, apesar de haver notável avanço dessas doenças, o diagnóstico e o tratamento das micoses ainda são complexos, pois exigem treinamento apropriado de profissionais da saúde, além de persistência dos pacientes para perseverar com tratamentos que se estendem por longos períodos e que contam com efeitos colaterais nocivos (BROWN et al., 2012).

Diferentemente de muitas micoses sistêmicas, a PCM é uma doença que acomete indivíduos imunocompetentes, podendo causar complicações e sequelas graves. Apesar disso, a notificação de casos no Brasil não é obrigatória e a doença segue negligenciada. Após 100 anos do seu descobrimento, ainda é necessário implementar um programa efetivo de prevenção, diagnóstico e tratamento no país (MARTINEZ, 2010).

O avanço ocorrido nas últimas décadas relacionado à doença se deveu, principalmente, aos estudos relativos à resposta imune dos hospedeiros infectados. Como já visto, trata-se de uma resposta extremamente complexa devido, entre outros fatores, a eficientes mecanismos de escape do fungo. Como já é sabido, uma resposta celular do tipo Th1, associada a Th17, é necessária para conter o micro-organismo (DE CASTRO et al., 2013). No entanto, a maneira pela qual essa resposta imune é induzida nos diferentes hospedeiros ainda é motivo de investigação. Sabe-se que uma resposta imune inata eficaz é fundamental para que isso ocorra e, nesse sentido, diferentes estudos já foram realizados, ressaltando a importância do reconhecimento fúngico pelas células no contexto da infecção (CALICH et al., 2008).

PRRs são alvos de estudos basilares para se entender a interação patógeno-hospedeiro, por se tratar de moléculas que reconhecem padrões moleculares conservados dos micro-organismos, geram respostas inatas efetoras e induzem respostas adaptativas específicas. Em relação aos fungos, CLRs são vitais para tal reconhecimento, pois se ligam a carboidratos

específicos de suas paredes celulares. Dentre esses receptores, Dectina-1 é um dos mais estudados, sendo importante por reconhecer diversos fungos, dentre eles, *P. brasiliensis* (LOURES et al., 2014; BROWN, 2011).

Outras CLR's são extensivamente estudadas na ativação da resposta imune e já foi demonstrado que Dectina-2 e Dectina-3 são importantes para a proteção contra vários microorganismos, especialmente fungos. Recentemente, um estudo comprovou a relevância desses receptores no reconhecimento de *P. brasiliensis* por células plasmocitóides humanas (PREITE et al., 2018). No entanto, ainda não estão descritas na literatura suas funções relacionadas aos modelos experimentais de infecção convencionais, como, por exemplo, BMDCs, BMDMs e camundongos. Tal caracterização é de suma importância para posterior aplicação em abordagens preventivas e de tratamento para uma doença que, apesar de negligenciada, é sabidamente uma séria questão social.

### 3 OBJETIVOS

---

“Quem tem um ‘porquê’ pode suportar quase qualquer ‘como’.”  
(Friedrich Nietzsche)

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos receptores CLRs Dectina-2 e Dectina-3 *in vitro* e *in vivo* na infecção por *P. brasiliensis* no modelo experimental murino

#### 3.2 Objetivos específicos

a-) Analisar o perfil da resposta imune inata, por meio:

- ✓ da cinética de produção de citocinas produzidas por células dendríticas e macrófagos infectados por *P. brasiliensis* na ausência dos receptores;
- ✓ da avaliação da importância dos receptores para a ativação de macrófagos infectados pelo fungo, mediante análises de recuperação de fungos viáveis (contagem de unidades formadoras de colônias – UFC), produção de NO, fagocitose e interação fungo/célula;

b-) Verificar a possibilidade de indução de resposta sinérgica entre os receptores Dectina-1 e Dectina-2, Dectina-3 e Mincle, por meio:

- ✓ da análise da produção de citocinas por células dendríticas infectadas, na ausência desses receptores de forma combinada;

c-) Determinar a relevância dos receptores na ativação da resposta imune adaptativa, por meio:

- ✓ da análise de citocinas produzidas na cocultura de linfócitos e células dendríticas infectadas com o fungo, na ausência de Dectina-2 e Dectina-3;
- ✓ da análise da expressão de CD80 e CD86 por células dendríticas infectadas na ausência dos receptores;

d-) Averiguar a importância de Dectina-2 para a indução de resposta imune protetora em camundongos, por meio:

- ✓ de análises histopatológicas no pulmão de camundongos deficientes infectados;

- ✓ da recuperação de fungos viáveis (por meio da contagem de UFC nos pulmões) e produção de citocinas em pulmões e fígados dos animais infectados;
- ✓ da observação da curva de sobrevivência dos camundongos deficientes infectados por *P. brasiliensis*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

“É uma grande escola de humildade dever fazer continuamente coisas que nos custam muita fadiga e que saem imperfeitas.”  
(Edith Stein)

### 4.1 Análises *in vitro*

#### 4.1.1 Obtenção de leveduras de *P. brasiliensis*.

O isolado virulento da cepa 18 (Pb18) de *P. brasiliensis* (KASHINO et al., 1990) foi cultivado em meio semi-sólido de BHI (*Brain Heart Infusion*)-ágar com gentamicina (100 µg/mL) e suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB – Gibco BRL, Life Technologies, Inc.) e 5% de solução de glicose a 30%, por 7 dias à temperatura média de 37°C. As leveduras foram então mantidas por repiques semanais para a infecção de células e camundongos.

Para a infecção das células ou animais, as leveduras foram transferidas para um tubo Falcon de 15ml contendo pérolas de vidro em meio RPMI-1640 (7ml) e vortexadas três vezes, por 10 segundos. Após 5 minutos de repouso, 1ml da suspensão (da porção superficial) foi transferido para eppendorf e passado sucessivamente através de agulha (U-100) para se desfazer possíveis grumos formados pelo fungo. Após tal procedimento, as leveduras foram contadas em Câmara de Neubauer para ajustes de concentração.

#### 4.1.2 Obtenção de células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea e infecção por *P. brasiliensis*.

Células de medula óssea foram obtidas por meio de lavagem de fêmur e tibia de camundongos isogênicos C57BL/6 selvagens ou deficientes de Dectina-2 ou Dectina-3, com meio RPMI-1640 para a obtenção de BMDCs (*Células dendríticas derivadas de medula óssea*) e BMDMs (*Macrófagos derivados de medula óssea*) segundo protocolo previamente descrito (LUTZ et al., 1999), com modificações. Em resumo, após a lavagem dos ossos dos camundongos, as células foram filtradas em *cell strainer* de 40 µm e centrifugadas (300 x g por 5 minutos) para posterior lise dos eritrócitos com uma solução tampão (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5). Após nova lavagem com meio RPMI-1640, o número total de células foi contado em Câmara de Neubauer para ajustes de concentração. Um total de 2 x 10<sup>6</sup> células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 – com HEPES (25 mM), gentamicina (50

mg/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 10% de SFB,  $\beta$ -mercaptoetanol (20 ng/mL) e GM-CSF (20 ng/mL) – por placa de Petri, e cultivadas por 8 dias, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

No terceiro dia de cultivo foram adicionados 10 mL do mesmo meio (RPMI-1640 com HEPES (25 mM), gentamicina (50 mg/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 10% de SFB,  $\beta$ -mercaptoetanol (20 ng/mL) e GM-CSF (20 ng/mL)) em cada placa de cultivo. Já no sexto dia da diferenciação, um total de 10 mL de suspensão de células de cada placa foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugado (por 5 minutos a 300 x g) para que o precipitado celular fosse ressuspensionado em meio novo e recolocado na placa de cultura original. Posteriormente, no oitavo dia da diferenciação, BMDCs e BMDMs foram separadas para experimentos. As células que não se apresentavam aderidas, ou se apresentavam fracamente aderidas na placa de Petri, foram consideradas células dendríticas e as aderidas, macrófagos.

BMDCs foram coletadas por meio de sucessivas lavagens das placas com meio RPMI-1640, transferidas em tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas (por 5 minutos a 300 x g) para posterior contagem em Câmara de Neubauer. Um total de  $2,5 \times 10^5$  células por poço, em um volume de 500  $\mu$ l de meio (RPMI-1640 + 10% de SFB), foram cultivadas em placas de 48 poços (KASVI) e infectadas por *P. brasiliensis* na proporção 2 BMDCs para 1 fungo (MOI 2:1). Tal infecção foi utilizada para todos os ensaios envolvendo células dendríticas.

Para que BMDMs fossem desaderidos das placas, foram acrescentados 3 mL do reagente TrypLE (Life Technologies) por placa de Petri. As placas foram então acondicionadas em estufa a 37°C por 20 minutos para posterior lavagem e transferência em tubos Falcon de 50 mL. Após centrifugação (5 minutos a 300 x g), as células foram ressuspensionadas e contadas para posterior infecção por *P. brasiliensis* na mesma proporção que as células dendríticas (2:1) – para os ensaios da cinética de produção de citocinas e acidificação de fagolisossomos – e na proporção 1:1 para ensaios de fagocitose/interação, UFC e produção de NO.

Para a análise da cinética de produção de citocinas, após 6 horas e 24 horas de infecção, os sobrenadantes de cultura foram coletados para posterior dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-27, IL-5, IL-4, IL-12p70 e quimiocina (CCL2) por meio de ensaios imunoenzimáticos, descritos posteriormente.

Ademais, BMDCs foram ainda previamente tratadas com diferentes estímulos (de acordo com protocolo dos fabricantes) – R406 (bloqueador de SyK), PAM3 (agonista de TLR2), Zymosan depletado (agonista de Dectina-1) e Pepinh-MyD88 (bloqueador de MyD88) – e posteriormente infectadas (MOI 2:1) pelo fungo. Após 24 horas de infecção, sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de TNF- $\alpha$ , para se verificar a relevância de diferentes PRRs na infecção por *P. brasiliensis*.

#### 4.1.3 Análise *in vitro* de indução de resposta complementar entre os receptores Dectina-1 e Dectina-2, Dectina-3 e Mincle

BMDCs selvagens ou deficientes de Dectina-1, Dectina-2 e Dectina-3 foram obtidas como descrito anteriormente no item 4.1.2 e cultivadas em placas de 48 poços (KASVI). No entanto, antes da infecção por *P. brasiliensis*, essas células foram previamente tratadas com anticorpos anti-Dectina-1, anti Dectina-2 ou anti-Mincle (10 $\mu$ g/mL), segundo protocolo dos fabricantes. Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  por ensaios imunoenzimáticos.

#### 4.1.4 Obtenção de linfócitos T e co-cultura com BMDCs

Camundongos isogênicos C57BL/6 selvagens foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub> e seus baços coletados para obtenção de leucócitos, predominantemente linfócitos T. Os baços foram macerados com o auxílio de êmbolo de seringa e suspensões celulares foram passadas através de *cell strainer* de 70  $\mu$ m em meio RPMI-1640 para posterior lavagem em centrífuga (300 x g por 5 minutos). O sedimento celular foi ressuspensionado em tampão de lise de eritrócitos (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) e novamente lavado (300 x g por 5 minutos) até que não houvesse mais indício de hemácias no sedimento. Após ressuspensão em um volume de 6 mL por baço, os esplenócitos totais foram transferidos para Placa de Petri e acondicionados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por duas horas.

As células que não aderiram na placa foram consideradas linfócitos T (uma vez que linfócitos B e macrófagos aderem fortemente à placa) e transferidas para tubo Falcon de 50 mL para posterior lavagem (300 x g por 5 minutos). O sobrenadante então foi descartado e as células foram ressuspensionadas em meio RPMI-1640 suplementado (1% de aminoácidos não essenciais; 1% de piruvato de sódio a 100 mM; 10% de SFB; 2 mM de L-glutamina; 50 $\mu$ M de 2 $\beta$ -mercaptoetanol; 50 mg/L de gentamicina) para contagem em câmara de Neubauer.

Para a co-cultura, BMDCs (2,5 x 10<sup>5</sup>/poço) foram previamente infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1), como previamente descrito, em placas de 48 poços. Após 6 horas de infecção, linfócitos T foram adicionados à cultura, na proporção de 8 linfócitos: 1 BMDC, em 500  $\mu$ l de meio suplementado por poço. Sobrenadantes foram coletados após 5 dias de co-cultura para detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-13, por meio de ensaios imunoenzimáticos, descritos posteriormente.

#### **4.1.5 Análise da maturação de BMDCs deficientes de Dectina-2 e 3 diante da infecção por *P. brasiliensis*.**

A determinação da ativação de BMDCs foi realizada pela quantificação das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 após infecção por *P. brasiliensis*. Células dendríticas ( $2 \times 10^6$ ) foram cultivadas em Placas de Petri, em meio RPMI-1640 com 10% de SFB e infectadas pelo fungo (MOI 2:1), como descrito anteriormente. Após 24 horas de infecção, as células foram lavadas com tampão PBS (300 x g, 5 minutos, 4°C) para posterior contagem em Câmara de Neubauer. Um total de  $3 \times 10^5$  células foram transferidas para eppendorfs em volume de 100 µl de PBS + 2% de SFB para marcação com os respectivos anticorpos, na ausência de luz.

A marcação foi realizada com os anticorpos anti-CD11c (APC, eBioscience), isotipo controle IgG1 (APC, Ebioscience), anti-CD80 (FITC, eBioscience) e anti-CD86 (FITC, eBioscience), de acordo com a distribuição dos grupos experimentais e instruções do fabricante. Após novas lavagens com PBS contendo 2% de SFB, as células foram mantidas em gelo e ressuspendidas para análise em citômetro de fluxo. Para a estratégia de seleção de células positivas foram selecionadas populações de células de acordo com tamanho e granulosidade para o tipo celular (BMDC) (SSC-A vs. FSC-A), excluídos os *doublets* (grumos de células) (FSC-A vs. FSC-W) e selecionadas células positivas para o marcador de identificação CD11c<sup>+</sup>.

#### **4.1.6 Determinação da atividade fungicida de macrófagos.**

Para a determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), BMDMs ( $2,5 \times 10^5$ /poço) foram infectadas por *P. brasilienses* na proporção 1 macrófago:1 fungo em placas de 48 poços, em um volume de 500 µL de RPMI-1640 com 10% de SFB e cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas e 48 horas. Sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de NO.

Após 24 horas de infecção, os poços foram lavados três vezes com meio RPMI-1640 para a retirada dos fungos não fagocitados e as placas que seriam analisadas após 48 horas de infecção, foram acondicionadas novamente em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada tempo determinado, após a lavagem, uma solução aquosa de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS a 0,05%) foi adicionada aos poços para a lise das células. A suspensão obtida foi então diluída (1:10) em meio RPMI-1640 e plaqueada em meio BHI-ágar suplementado com 5% de SFB e 5% de glicose a 30% para incubação em estufa a 37°C por 8 dias. A avaliação da atividade fungicida dos macrófagos foi determinada por meio da contagem de fungos viáveis recuperados.

#### **4.1.7 Determinação do índice de fagocitose/interação de *P. brasiliensis* com BMDMs.**

BMDMs ( $5 \times 10^4$ /poço) foram infectados por *P. brasiliensis* na proporção 2 macrófagos:1 fungo em placas de 96 poços, em um volume de 100  $\mu$ l de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de infecção, os poços foram gentilmente lavados com o meio de cultura e corados com o kit panótico rápido (LB laborclin ref. 620529) para posterior contagem de leveduras aderidas à membrana celular (interação) ou internalizadas (fagocitose). A porcentagem de macrófagos que interagiram com o fungo, assim como o índice de fagocitose/interação, foram calculados.

Para o cálculo da porcentagem de células ativadas foi realizada uma contagem aleatória de 100 BMDMs por poço. Dentre as 100 células, aquelas que haviam fagocitado o fungo foram consideradas ativadas. E, para a determinação do índice, foi utilizada a seguinte fórmula (LEONHARDT, 2014):

$$\text{Índice de fagocitose/interação} = \frac{\text{média de fungos internalizados ou em interação com as células}}{\text{média de macrófagos ativados}}$$

A média foi considerada devido ao fato dos experimentos terem sido conduzidos em triplicata.

#### **4.1.8 Avaliação da produção de NO por BMDMs infectados.**

Os sobrenadantes da cultura de BMDMs infectados por *P. basiliensis* foram coletados em 24 e 48 horas após infecção para a determinação indireta de NO, por meio da quantificação de nitrito (NO<sup>2-</sup>), segundo o protocolo de Green e colaboradores (1981), formando a reação colorimétrica de Griess. Em resumo, as amostras dos sobrenadantes de cultura foram colocadas em placas de 96 poços e uma curva de diluição seriada de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) foi realizada em paralelo para análise de suas concentrações. Em seguida, foi adicionada a solução de Griess em todos os poços, formando um composto de coloração rósea, quantificado por espectrofotômetro (520-550 nm). As concentrações das amostras foram determinadas de acordo com a densidade óptica (DO) da curva padrão.

#### **4.1.9 Avaliação da produção de citocinas e quimiocina por ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA).**

As dosagens das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-27, IL-5, IL-4, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-13, TGF- $\beta$  e quimiocina CCL2 foram realizadas por meio da técnica

ELISA tipo *sandwich*, segundo protocolos recomendados pelos fabricantes (IFN- $\gamma$ , BD Biosciences, EUA; as demais, eBiosciences, San Diego, EUA). Resumidamente, placas de poliestireno de alta afinidade de 96 poços foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura durante a noite, à temperatura de 4°C. Após 3 lavagens das placas com PBS contendo 0,05% de Tween 20, foi realizado um bloqueio de sítios de ligação inespecífica com as soluções de cada fabricante por 1 hora, à temperatura ambiente. Após novas lavagens, os sobrenadantes de cultura ou macerados de tecidos foram adicionados e, paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas, em diluições duplas seriadas, para análise das concentrações. As amostras para a dosagem de TNF- $\alpha$  foram diluídas (5:1) antes de serem adicionadas à placa.

As placas foram então deixadas à temperatura de 4°C durante a noite e, no terceiro dia, foram novamente lavadas 3 vezes. De acordo com cada fabricante, as placas foram incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinizados por 1 hora, à temperatura ambiente e, após novas lavagens, adicionou-se o conjugado estreptavidina-peroxidase. Após 30 minutos de incubação com a enzima, à temperatura ambiente e abrigadas da luz, as placas foram novamente lavadas. Ao final do último ciclo de lavagens, adicionou-se às placas o substrato enzimático TMB (tetrametilbenzidina) para a revelação da reação. A densidade óptica (OD) foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm e as concentrações das amostras foram determinadas de acordo com a DO da curva padrão.

## 4.2 Análises *in vivo*

### 4.2.1 Infecção de camundongos.

Para todos os ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos isogênicos machos, com 8 a 12 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) e geneticamente deficientes ( $^{-/-}$ ) dos receptores Dectina-2 ou Dectina-3. Os animais deficientes foram gentilmente doados pelo professor doutor Bruce Klein, da Universidade de Wisconsin, em Madison, nos Estados Unidos. Todos os camundongos foram criados no biotério do Instituto de Biologia – UnB, mantidos em condições padrões de temperatura e luz, com água e alimentação “*ad libitum*” conforme projeto aprovado pela comissão de Ética Animal (CEUA) da UnB (Nº 55924/2016).

Para análise da curva de sobrevivência, seis animais por grupo (como indicado na tabela 1) foram infectados, por via endovenosa, com  $1,5 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18 e matidos em

biotério por 40 semanas. Os camundongos foram observados semanalmente para o registro dos óbitos.

Para análises histopatológicas, carga fúngica tecidual e secreção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17, TGF- $\beta$  e IL-13) nos pulmões e fígados, foram utilizados seis animais por grupo, conforme a tabela 2. Os camundongos foram infectados por via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de *P. brasiliensis* (Pb18) e, após 30 e 60 dias de infecção, 3 animais de cada grupo foram eutanasiados para realização dos ensaios citados.

**Tabela 1. Representação dos grupos de animais infectados para análise de sobrevivência**

GRUPOS	ANIMAIS
Dectina-2 WT	6
Dectina-2 <sup>(-/-)</sup>	6
Dectina-3 WT	6
Dectina-3 <sup>(-/-)</sup>	6

**Tabela 2. Representação dos grupos de animais infectados para análises histopatológicas, produção de citocinas e contagem de leveduras viáveis recuperadas.**

GRUPOS	ANIMAIS
Dectina-2 WT	6
Dectina-2 <sup>(-/-)</sup>	6

Em cada tempo determinado, os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub> para a coleta asséptica de pulmões e fígados. Os órgãos foram pesados e parte do pulmão direito foi coletado e armazenado em solução tampão fixadora (PBS + 10% de formaldeído) para posterior análise histopatológica. O restante dos pulmões e fígados foram homogenizados em 1 mL de PBS estéril com auxílio de um homogenizador (Precellys 24 tissue homogenizer; EUA) e, após centrifugação (300 x g por 5 minutos, a 4°C) do macerado, 400  $\mu$ l da amostra foi armazenada em freezer a -80°C para posterior análise das citocinas; e o restante, semeados em placas de Petri contendo meio BHI-ágar suplementado com 5% de SFB e 5% de solução de glicose a 30%. As placas foram mantidas em estufa por um período de 8 dias, à temperatura de 37°C, para posterior avaliação da recuperação de fungos viáveis e contagem de UFC. Os valores contados foram expressos por grama de tecido.

#### **4.2.2 Análises histopatológicas.**

Amostras de tecido pulmonar foram fixadas em tampão formalina (PBS + 10% de formaldeído) para posterior desidratação e diafanização em concentrações crescentes de álcool e xilol. Após esse procedimento, as amostras foram incluídas em parafina para a confecção de cortes em micrótomo. Os cortes foram depositados em lâminas microscópicas e incubados em estufa para sua fixação. Em seguida, foram lavados em xilol para a retirada do excesso de parafina, e hidratados com concentrações decrescentes de álcool, a fim de posteriormente serem corados com hematoxilina e eosina (HE) para análises histopatológicas. As técnicas descritas foram realizadas no Laboratório de Patologia da Universidade de Brasília.

#### **4.3 Análise estatística.**

Os cálculos estatísticos e a confecção dos gráficos foram realizados com a utilização do *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As comparações entre os respectivos grupos controles e deficientes de cada receptor foram realizadas pelo teste *t* de Student quando a distribuição das amostras era paramétrica e pelo teste de Mann–Whitney em distribuições não paramétricas. Os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

---

“Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.”  
(Guimarães Rosa)

### 5.1 CLR<sub>s</sub> são essenciais para o reconhecimento de *P. brasiliensis* por BMDC<sub>s</sub>

Para se confirmar inicialmente a relevância de TLR<sub>s</sub> e CLR<sub>s</sub> no reconhecimento de *P. brasiliensis*, BMDC<sub>s</sub> selvagens foram previamente tratadas com diferentes agonistas – Zymosan depletado, PAM3 – e/ou bloqueadores de SyK ou MyD88 – R406, e Pepinh-MyD88, respectivamente – e, posteriormente, infectadas pelo fungo. Após 24 horas de infecção, sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de TNF- $\alpha$  (Fig. 9A).

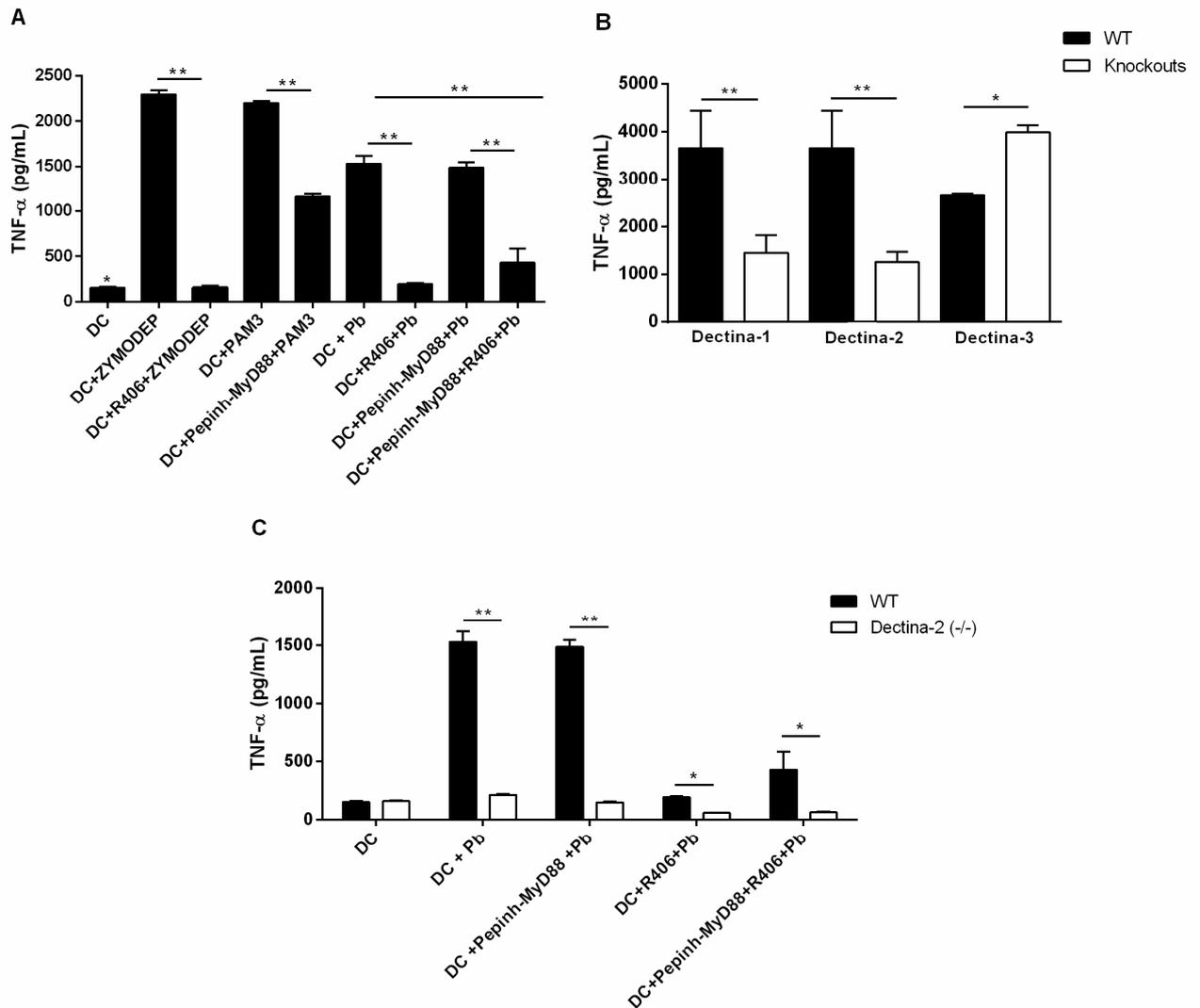
As células tratadas com o agonista de Dectina-1 – Zymosan depletado – produziram maior quantidade da citocina em comparação com aquelas previamente tratadas com o bloqueador de SyK na presença do agonista. Da mesma forma, BMDC<sub>s</sub> tratadas com PAM3 – agonista de TLR2 – secretaram mais TNF- $\alpha$  em comparação com aquelas previamente tratadas com o inibidor de MyD88, na presença do respectivo agonista (Fig. 9A).

Notavelmente, não houve diferença significativa na secreção de TNF- $\alpha$  por BMDC<sub>s</sub> previamente tratadas com o inibidor de MyD88 e infectadas com *P. brasiliensis* e aquelas somente infectadas pelo fungo, sem prévio estímulo. Em contraste, as células previamente tratadas com o inibidor de SyK e infectadas, secretaram significativamente menor quantidade da citocina em relação às não estimuladas e infectadas (Fig. 9A). As células previamente tratadas com ambos os inibidores de SyK e MyD88 e infectadas posteriormente apresentaram produção de TNF- $\alpha$  semelhante àquelas tratadas apenas com o inibidor de SyK e infectadas (Fig. 9A). Tais resultados sugerem que, quando há infecção por *P. brasiliensis*, existe uma maior relevância de CLR<sub>s</sub> na indução da secreção de TNF- $\alpha$  em comparação com os TLR<sub>s</sub>.

Após tal inferência, fez-se necessário analisar qual receptor estaria envolvido nessa resposta. Assim sendo, BMDC<sub>s</sub> deficientes de Dectina-1, Dectina-2 ou Dectina-3 – Knockouts, como indicado na Figura 9B – foram infectadas pelo fungo e sobrenadantes de cultura foram coletados, após 24 horas de estímulo, para a dosagem de TNF- $\alpha$ . Células deficientes de Dectina-1 e Dectina-2 secretaram uma quantidade menor da citocina, em comparação com as células selvagens. Células dendríticas deficientes de Dectina-3, todavia, apresentaram uma maior produção de TNF- $\alpha$  em comparação com aquelas selvagens.

Para validar a importância de Dectina-2 na produção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*, células selvagens e deficientes do receptor foram previamente tratadas com R406 e Pepinh-MyD88 e infectadas pelo fungo. Após 24 horas de infecção, sobrenadantes de cultura foram coletados para a análise da secreção da citocina (Fig. 9C). Em todos os grupos testados, a produção de TNF- $\alpha$  por células deficientes de Dectina-2 foi significativamente menor do que a produção daquelas selvagens, independente do tratamento prévio com bloqueadores de MyD88 e SyK (Fig. 9C).

Portanto, pode-se afirmar que CLR's possuem um papel fundamental na produção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis* e, dentre elas, Dectina-1 (como previamente descrito em LOURES et al., 2014) e Dectina-2 são essenciais ao desempenhar essa função.



**Figura 9. A secreção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas por *P.brasiliensis* é dependente de Receptores de Lectina do Tipo-C, especialmente Dectina-1 e Dectina-2.**

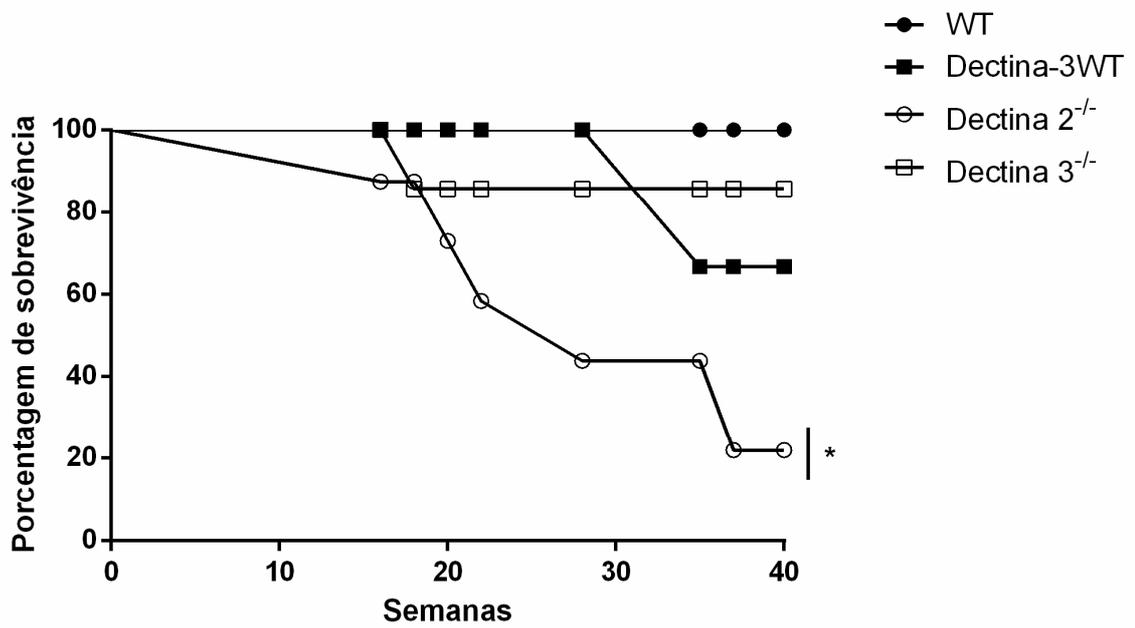
(A) BMDCs de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram previamente tratadas com bloqueadores de SyK (R406) e/ou MyD88 (Pepinh-MyD88) e infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). (B) BMDCs de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-1, Dectina-2 ou Dectina-3 foram infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). (C) BMDCs de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 foram previamente tratadas com bloqueadores de SyK (R406) e/ou MyD88 (Pepinh-MyD88) e infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de infecção para dosagem de TNF- $\alpha$  em todos os ensaios. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata.

## 5.2 Dectina-2 é necessária para a sobrevivência de camundongos infectados por *P. brasiliensis*.

Devido à relevância atestada dos CLR's na secreção de TNF- $\alpha$  – citocina importante para a contenção do fungo –, camundongos C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 e Dectina-3 foram infectados, por via endovenosa, com  $1,5 \cdot 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18), para averiguação de seus papéis na sobrevivência desses animais (Fig. 10).

Mais de 80% de camundongos selvagens e deficientes de Dectina-3 sobreviveram ao longo de 40 semana após a infecção pelo fungo. O único óbito registrado no grupo daqueles deficientes de Dectina-3 foi verificado antes da vigésima semana após a infecção, enquanto o óbito registrado no grupo dos selvagens foi observado após a trigésima semana de infecção (Fig. 10).

Notadamente, apenas cerca de 20% dos camundongos deficientes de Dectina-2 sobreviveram após as 40 semanas de observação, enquanto não houve óbitos verificados no grupo de seus respectivos controles (Fig. 10). Dessa forma, é possível conjecturar o importante papel de Dectina-2 na infecção por *P. brasiliensis*.



**Figura 10. Dectina-2 desempenha um importante papel para a sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por *P. brasiliensis*.**

Camundongos selvagens para Dectina-2<sup>-/-</sup> (WT) ou Dectina-3<sup>-/-</sup> (Dectina-3 WT) e deficientes de Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) e Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* por via endovenosa (Pb18 - 1,5.10<sup>6</sup> leveduras) e observados durante 40 semanas para a estimativa de sobreviventes. \* p ≤ 0,05.

### 5.3 Dectina-2 – e não Dectina-3 – é essencial para a indução da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ por fagócitos murinos na infecção por *P. brasiliensis*.

Para entender como Dectina-2 atua na resistência contra a infecção por *P. brasiliensis* e devido à constatação da influência dos receptores Dectina-2 e Dectina-3 na produção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas, foi verificada a cinética da produção de citocinas secretadas por BMDCs e BMDMs deficientes de cada receptor. Dessa forma, após a infecção das células pelo fungo, sobrenadantes de cultura foram coletados depois de 6 e 24 horas de estímulo para a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-27, IL-5, IL-4, IL-12p70 e quimiocina CCL2 (Figuras 11 e 12).

BMDCs derivadas de camundongos deficientes de Dectina-2 apresentaram uma diminuição significativa na secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em 6 e 24 horas após a infecção por *P. brasiliensis*, enquanto IL-10 e IL-1 $\beta$  apresentaram sua menor concentração em sobrenadantes de cultura de 24 horas após a infecção pelo fungo. Não houve diferença na secreção da quimiocina CCL2 por BMDCs deficientes de Dectina-2 infectadas em nenhum tempo avaliado (Fig. 11A).

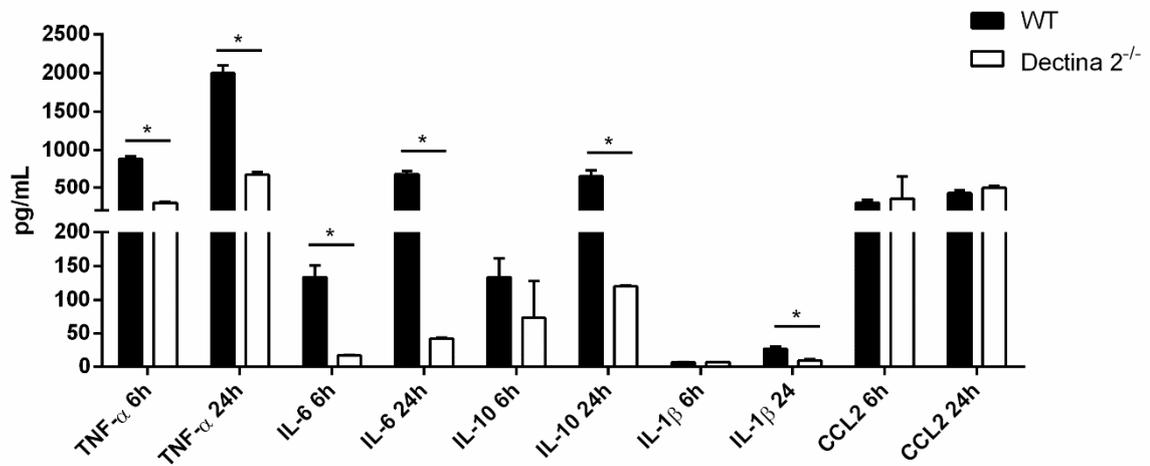
De forma semelhante, BMDMs deficientes de Dectina-2 também apresentaram uma secreção significativamente reduzida de TNF- $\alpha$  e IL-6 em 24 horas e IL-6 em 6 horas após a infecção. Contudo, não foi detectada diferença significativa na secreção de IL-10, IL-1 $\beta$  e CCL2 por essas células, nos tempos pré-determinados (Fig. 11B).

Em contraste, BMDCs de camundongos deficientes de Dectina-3 apresentaram uma maior secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em 24 horas de infecção, em comparação com aquelas selvagens (Fig. 12A). BMDMs deficientes do receptor não apresentaram diferenças significativas na secreção de nenhuma citocina avaliada em 6 e 24 horas após a infecção (Fig. 12B).

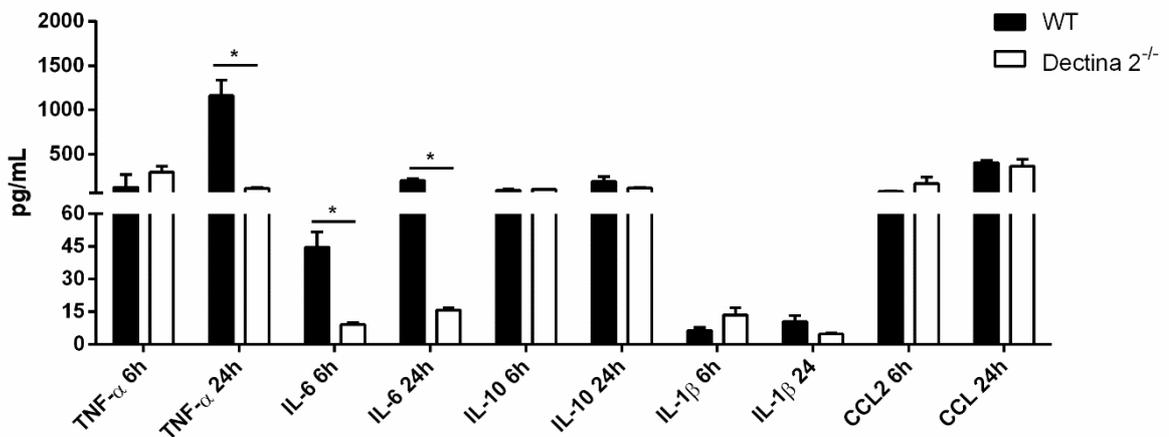
Tais respostas sugerem que Dectina-2 desempenha um importante papel para a produção de outras citocinas, além de TNF- $\alpha$ , por células dendríticas e macrófagos, enquanto Dectina-3 parece não ter a mesma função nas mesmas condições.

A secreção de IL-23, IL-27, IL-5, IL-4 e IL-12p70 por BMDCs e BMDMs selvagens e deficientes de Dectina-2 ou Dectina-3 não foi detectada nos tempos estabelecidos.

A

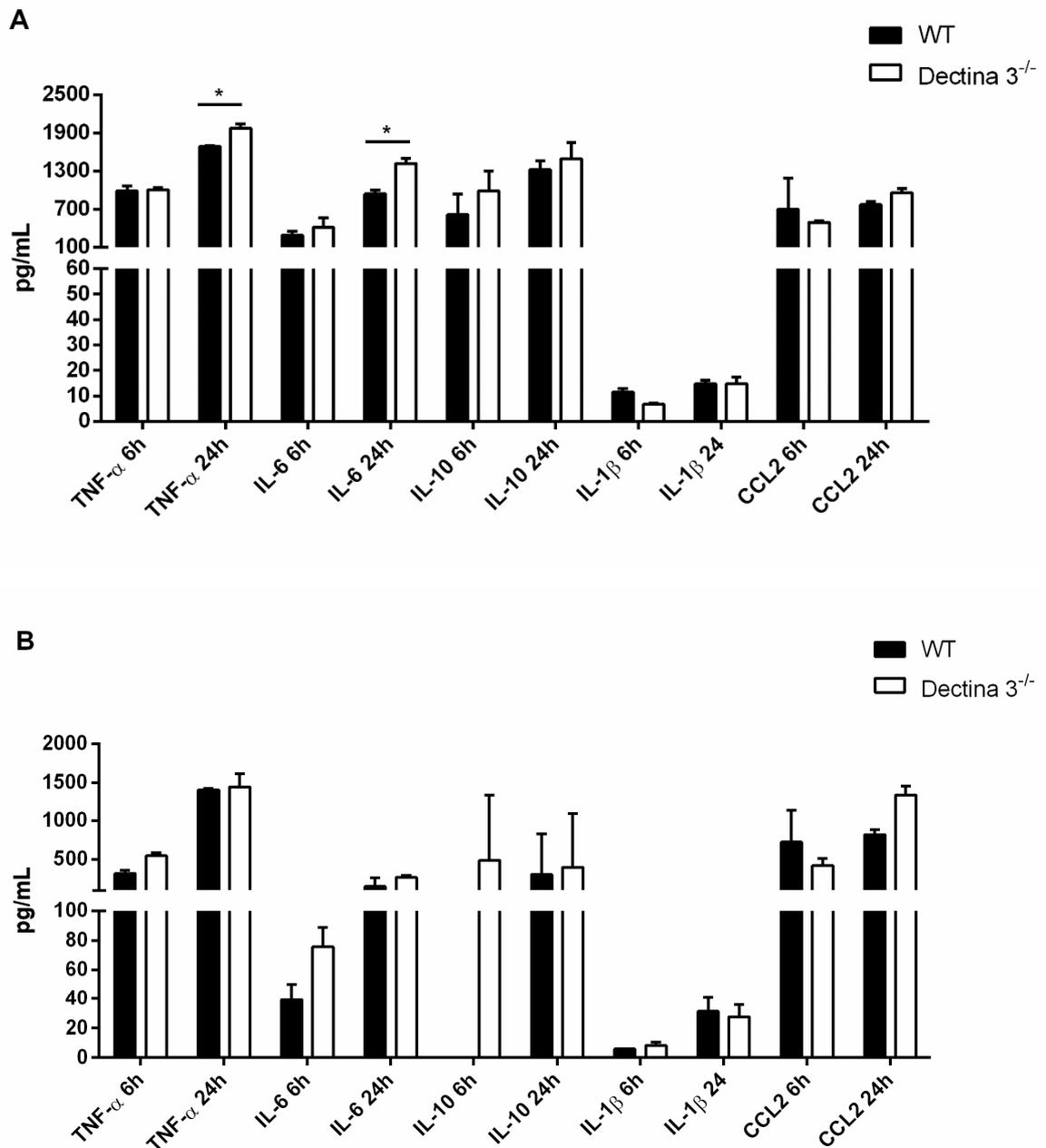


B



**Figura 11. Cinética da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 IL-1 $\beta$  e CCL2 por BMDCs e BMDMs deficientes de Dectina-2 infectadas por *P. brasiliensis*.**

BMDCs (A) e BMDMs (B) de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 2:1) e sobrenadantes de cultura foram coletados após 6 e 24 horas de infecção para dosagem das citocinas e quimiocina indicadas. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata.



**Figura 12.** Cinética da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  e CCL2 por BMDCs e BMDMs deficientes de Dectina-3 infectadas por *P. brasiliensis*.

BMDCs (A) e BMDMs (B) de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 2:1) e sobrenadantes de cultura foram coletados após 6 e 24 horas de infecção para dosagem das citocinas e quimiocina indicadas. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

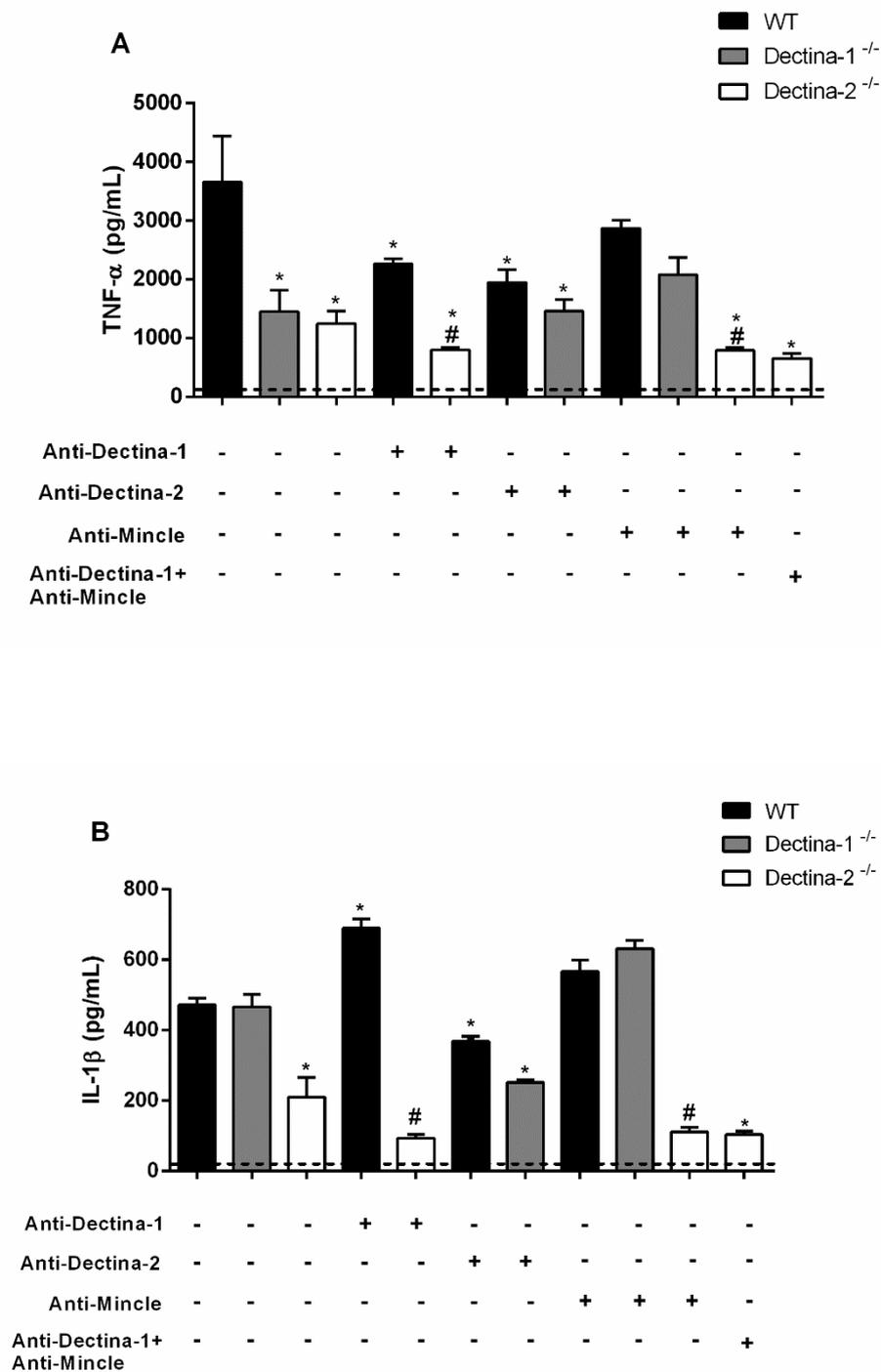
#### 5.4 Interação entre Dectina-1 e Dectina-2, Dectina-3 e Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*.

Devido à constatação na literatura de ação sinérgica entre CLRs, tornou-se interessante verificar a interação entre Dectina-1, Dectina-2, Dectina-3 e Mincle na infecção por *P. brasiliensis*. Para isso, BMDCs de camundongos selvagens foram tratadas com anticorpos anti-Dectina-1, anti-Dectina-2 e/ou anti-Mincle, enquanto aquelas deficientes de Dectina-1 foram tratadas com anticorpos anti-Dectina-2 ou anti-Mincle, anteriormente à infecção por *P. brasiliensis*. Da mesma forma, as células deficientes de Dectina-2 foram tratadas com anticorpos anti-Dectina-1 e/ou anti-Mincle, enquanto aquelas deficientes de Dectina-3, foram tratadas com anti-Mincle, previamente à infecção pelo fungo, para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$ , após 24 horas de interação (Figuras 13 e 14).

Como já observado, células dendríticas deficientes de Dectina-1 e Dectina-2 produziram menor quantidade de TNF- $\alpha$  em comparação com aquelas selvagens. O mesmo pôde ser verificado quando ambos os receptores estavam ausentes ao mesmo tempo. Ademais, somente o bloqueio de Mincle não foi capaz de alterar a secreção de TNF- $\alpha$  pelas células infectadas; todavia, uma menor secreção da citocina foi observada nas BMDCs deficientes de Dectina-2 após tal bloqueio (Fig. 13A). Tal observação indica a importância de Dectina-1 e Dectina-2, mas não de Mincle, para a produção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas pelo fungo.

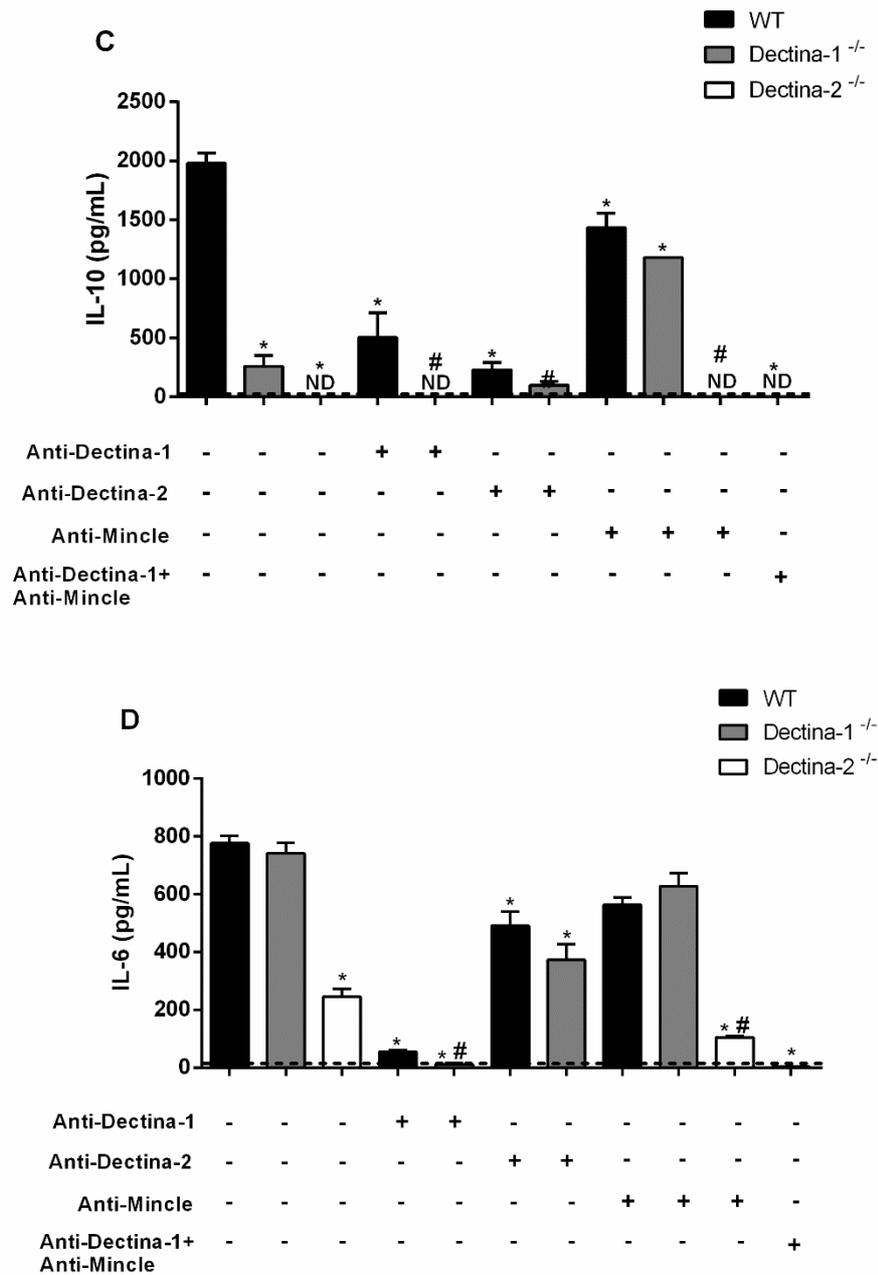
Dectina-2 se mostrou mais relevante na produção de IL-1 $\beta$ , uma vez que as células deficientes do receptor – ou o seu bloqueio – apresentaram significativamente uma menor secreção da citocina (Fig. 13B). Tal resposta não foi percebida para Dectina-1 e Mincle separadamente. No entanto, a secreção de IL-10 se mostrou dependente de Dectina-1, Dectina-2 e Mincle, uma vez que a ausência de cada receptor, separadamente ou em conjunto, influenciou negativamente a sua produção (Fig. 13C). Ademais, tanto a ausência como o bloqueio de Dectina-2, e o bloqueio de Dectina-1, também resultaram em uma menor produção de IL-6 por células dendríticas, enquanto o bloqueio de Mincle não influenciou nessa resposta (Fig. 13D).

Apesar de serem observadas influências de Dectina-1 e Dectina-2 na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*, não foi possível detectar a interação desses receptores para tais respostas.



**Figura 13.** Não há interação de Dectina-2 com Dectina-1 ou Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*.

BMDCs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-1 (Dectina-1<sup>-/-</sup>) ou Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram previamente tratadas com anticorpos anti-Dectina-1, anti-Dectina-2 e/ou anti-Mincle, como indicado, e posteriormente infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de infecção para dosagem das citocinas. \*  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo WT não tratado; #  $p \leq 0,05$  em comparação ao respectivo WT. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. A linha pontilhada corresponde à produção de citocinas de células não estimuladas.



**Figura 14.** Não há interação de Dectina-2 com Dectina-1 ou Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*.

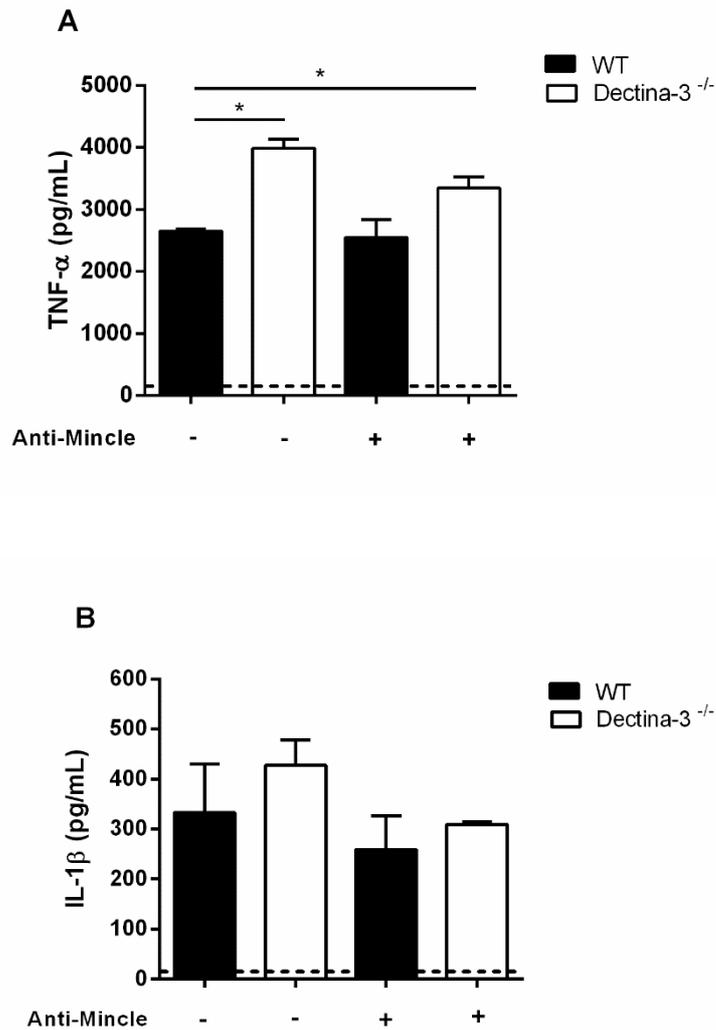
BMDCs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-1 (Dectina-1<sup>-/-</sup>) ou Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram previamente tratadas com anticorpos anti-Dectina-1, anti-Dectina-2 e/ou anti-Mincle, como indicado, e posteriormente infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de infecção para dosagem das citocinas. \*  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo WT não tratado; #  $p \leq 0,05$  em comparação ao respectivo WT. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. A linha pontilhada corresponde à produção de citocinas de células não estimuladas.

Novamente, células dendríticas deficientes de Dectina-3 secretaram maiores quantidades de TNF- $\alpha$  e IL-6 em comparação com o controle (Fig. 14A e 14D), enquanto a secreção de IL-1 $\beta$  e IL-10 por essas células não foi alterada (Fig. 14B e 14C).

De maneira interessante, o bloqueio de Mincle foi capaz de alterar a produção de IL-6 nas células deficientes de Dectina-3, diminuindo a produção dessa citocina e igualando-a ao controle (Fig. 14D). Entretanto, tal alteração do padrão de resposta para TNF- $\alpha$  não foi observada (Fig. 14A).

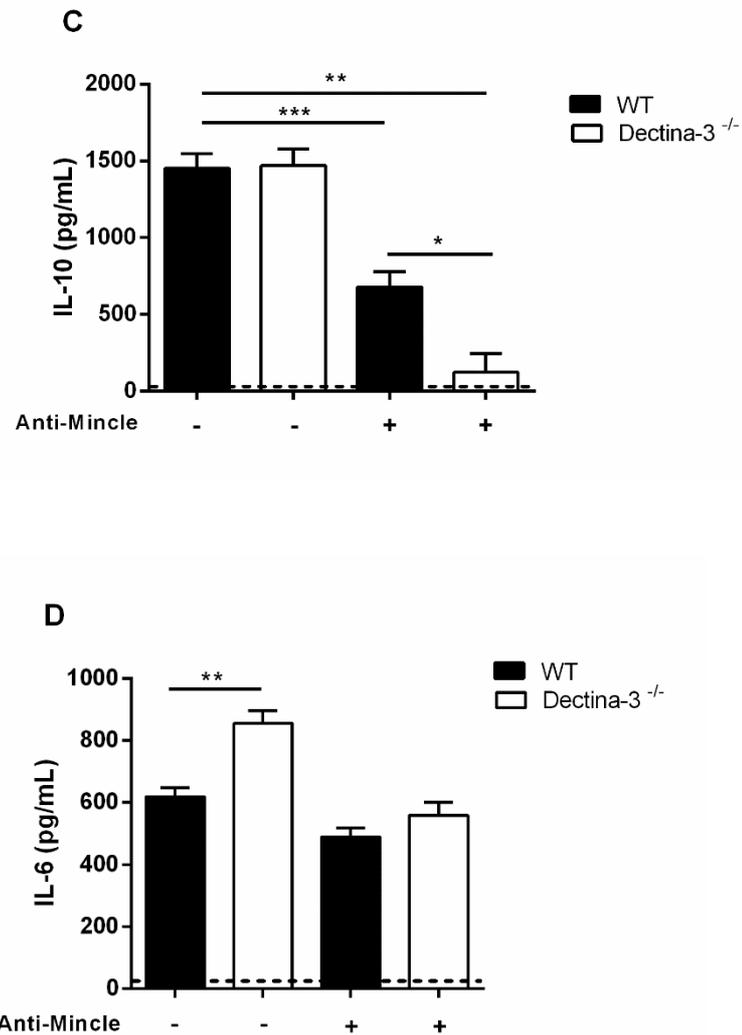
A produção de IL-1 $\beta$  não foi alterada pela ausência de Dectina-3 ou Mincle (Fig. 14B). Já a produção de IL-10 se mostrou dependente de Mincle (Fig. 14C), uma vez que o bloqueio desse receptor diminuiu significativamente sua produção. Células deficientes de Dectina-3 apenas apresentaram uma diminuição da citocina quando foram também tratadas com anti-Mincle.

Dessa forma, pode-se afirmar que Dectina-3 não possui um papel relevante na produção de IL-1 $\beta$  e IL-10 e, ainda, não parece se associar ao Mincle na infecção por *P. brasiliensis*.



**Figura 15.** Não há interação de Dectina-3 com Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*.

BMDCs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram previamente tratadas com anticorpos anti-Mincle e posteriormente infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de infecção para dosagem das citocinas. \*  $p \leq 0,05$ . \*\*  $p \leq 0,01$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. A linha pontilhada corresponde à produção de citocinas de células não estimuladas.



**Figura 16. Não há interação de Dectina-3 com Mincle para a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*.**

BMDCs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram previamente tratadas com anticorpos anti-Mincle e posteriormente infectadas por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de infecção para dosagem das citocinas. \*  $p \leq 0,05$ . \*\*  $p \leq 0,01$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. A linha pontilhada corresponde à produção de citocinas de células não estimuladas.

### **5.5 Dectina-2 é necessária para a atividade fagocítica e fungicida de macrófagos murinos na infecção *in vitro* por *P. brasiliensis*.**

Além da secreção de citocinas por fagócitos infectados pelo fungo, foram avaliadas as atividades fagocítica e fungicida de BMDMs de camundongos selvagens ou deficientes de Dectina-2 e Dectina-3 (Figuras 15 a 20).

Primeiramente, essas células foram infectadas por *P. brasiliensis* (Pb 18) e, após 24 horas de interação, foram fixadas e coradas como previamente descrito (LEONHARDT, 2014) para a determinação da porcentagem de células que apresentaram capacidade fagocítica e a estimativa de sua eficiência (Fig. 15 e 18).

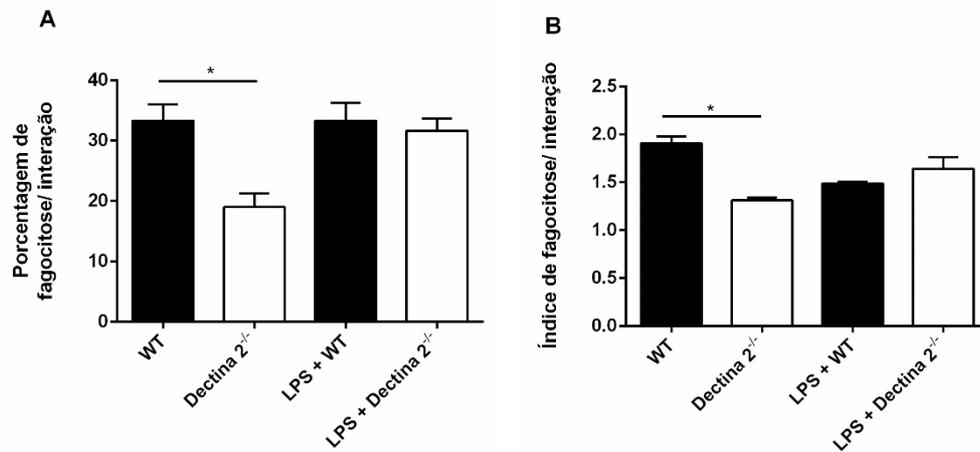
Macrófagos deficientes de Dectina-2 apresentaram uma porcentagem significativamente mais baixa de células capazes de fagocitar o fungo, em comparação com as selvagens (Fig. 15A). Da mesma forma, o índice de fagocitose/interação desse grupo também foi menor, indicando que o número de fungos fagocitados por célula é significativamente menor nos macrófagos deficientes de Dectina-2 (Fig. 15B). BMDMs deficientes de Dectina-3, por sua vez, não apresentaram diferença significativa na porcentagem ou no índice de fagocitose/interação (Fig. 18A e 18B).

Diante do que foi observado para Dectina-2, fez-se necessário avaliar a atividade fungicida dessas células. BMDMs foram infectadas por *P. brasiliensis* e, 24 e 48 horas após a infecção, foram lisadas e seus produtos plaqueados em meio de cultura (como descrito no item 4.1.6 de materiais e métodos) para a detecção de leveduras viáveis recuperadas, por meio de contagem de UFC (Fig. 16 e 19). Ademais, os sobrenadantes dessa cultura foram coletados para a dosagem de NO (Fig. 17 e 20).

O número de leveduras recuperadas de macrófagos derivados de camundongos deficientes de Dectina-2 foi significativamente maior do que daqueles selvagens, tanto em 24 como em 48 horas após a infecção (Fig. 16). BMDMs deficientes de Dectina-3 não apresentaram diferença na atividade fungicida em comparação com aquelas selvagens, em 24 horas de infecção. No entanto, em 48 horas, essas células apresentaram significativamente um menor número de UFC (Fig. 19).

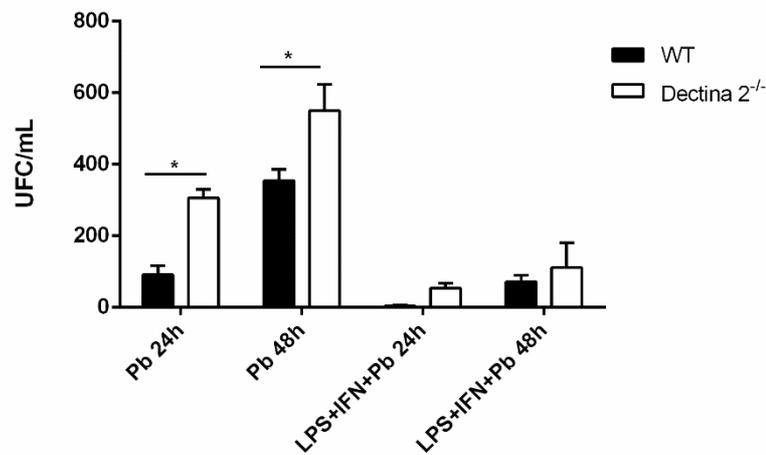
Em geral, como demonstrado nas Figuras 17 e 20, houve uma baixa produção de NO pelas células – selvagens e deficientes de Dectina-2 ou Dectina-3 – infectadas com *P. brasiliensis*. Ainda assim, foi possível detectar uma redução significativa de sua secreção pelos BMDMs deficientes de Dectina-2, tanto em 24, como em 48 horas de infecção em comparação com o controle (Fig. 17). Tal diferença não foi observada para as células deficientes de Dectina-3 (Fig. 20).

Em conjunto, tais resultados apontam para a importância de Dectina-2, e não Dectina-3, na fagocitose e na atividade fungicida de macrófagos infectados por *P. brasiliensis*.



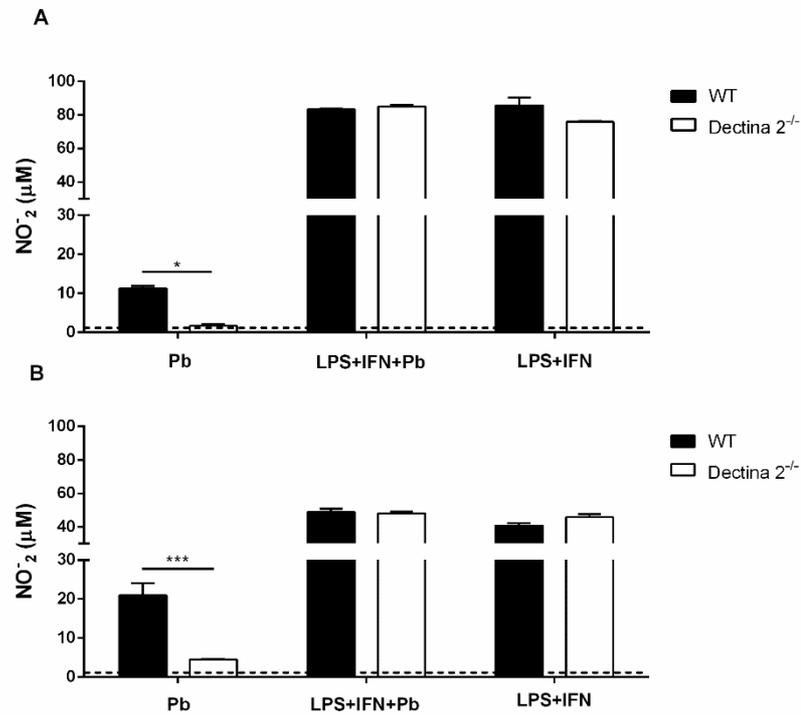
**Figura 17. Dectina-2 está envolvida na atividade fagocítica de BMDMs.**

BMDMs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Após 24h de interação, a porcentagem (A) e o índice de fagocitose/interação (B) foram calculados. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. LPS: lipopolissacarídeo.



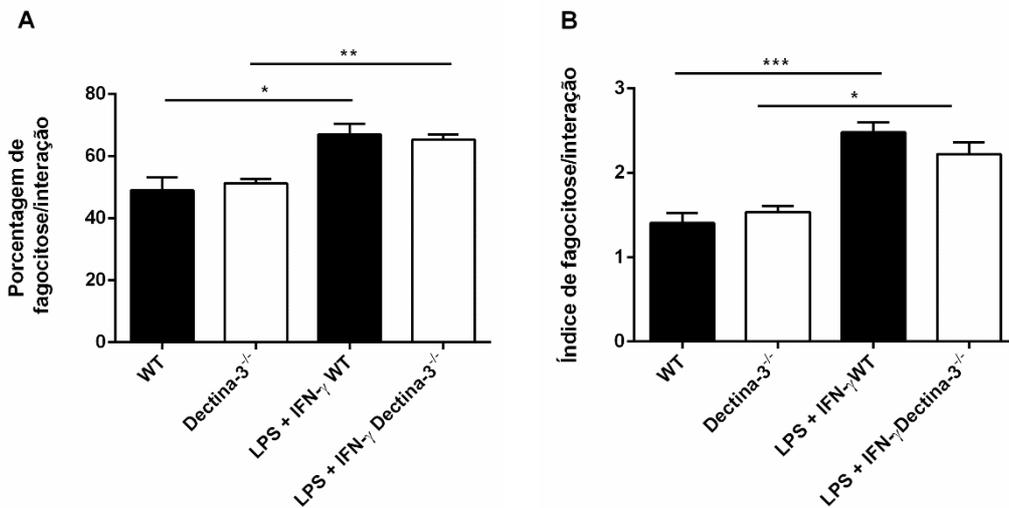
**Figura 18. Dectina-2 está envolvida na atividade fungicida de BMDMs.**

BMDMs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 1:1) e após 24 ou 48 horas de infecção, a quantidade de leveduras viáveis foi determinada. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. LPS: lipopolissacarídeo; IFN: interferon- $\gamma$ ; Pb: *P. brasiliensis*.



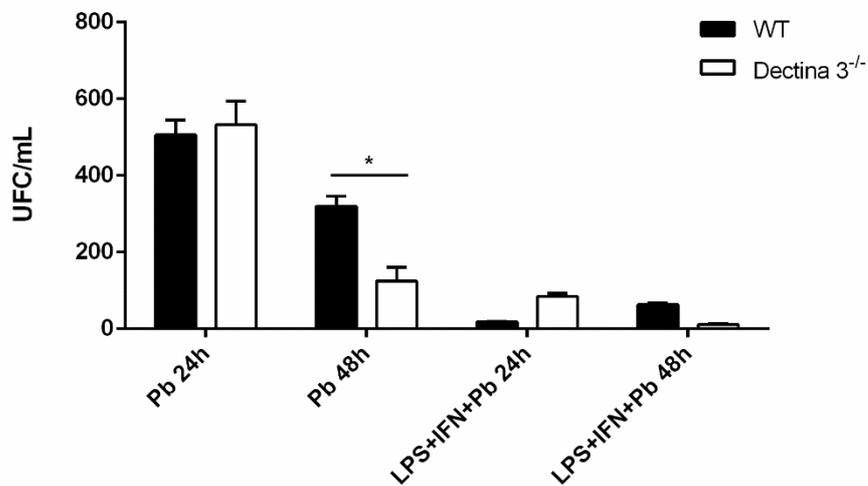
**Figura 19.** A deficiência de Dectina-2 afeta a produção de NO por BMDMs.

BMDMs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 1:1) para dosagem de NO após 24 horas (A) e 48 horas (B) de infecção. \*  $p \leq 0,05$  \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. NO: óxido nítrico; LPS: lipopolissacarídeo; IFN: interferon- $\gamma$ ; Pb: *P. brasiliensis*. A linha pontilhada corresponde à produção de NO de células não estimuladas.



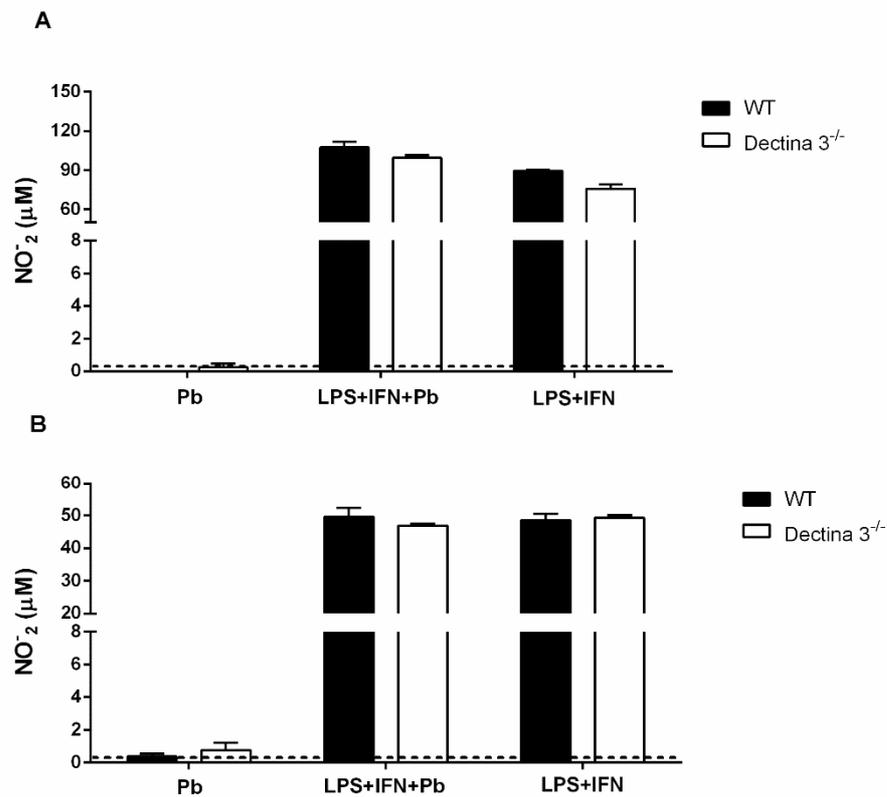
**Figura 20. Dectina-3 não está envolvida na atividade fagocítica de BMDMs.**

BMDMs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 2:1). Após 24h de interação, a porcentagem (A) e o índice de fagocitose/interação (B) foram calculados. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata. LPS: lipopolissacarídeo; IFN: interferon- $\gamma$ .



**Figura 21. Dectina-3 não está envolvida na atividade fungicida de BMDMs.**

BMDMs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 1:1) e após 24 e 48 horas de infecção, a quantidade de leveduras viáveis recuperadas foi determinada. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. LPS: lipopolissacarídeo; IFN: interferon- $\gamma$ ; Pb: *P. brasiliensis*.



**Figura 22.** A deficiência de Dectina-3 não afeta a produção de NO por BMDMs.

BMDMs de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 1:1) para dosagem de NO após 24 horas (A) e 48 horas (B) de infecção. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. NO: óxido nítrico; LPS: lipopolissacarídeo; IFN: interferon- $\gamma$ ; Pb: *P. brasiliensis*. A linha pontilhada corresponde à produção de NO de células não estimuladas.

## 5.6 A resposta imune adaptativa protetora contra *P. brasiliensis* é dependente de Dectina-2 em modelo de infecção *in vitro*.

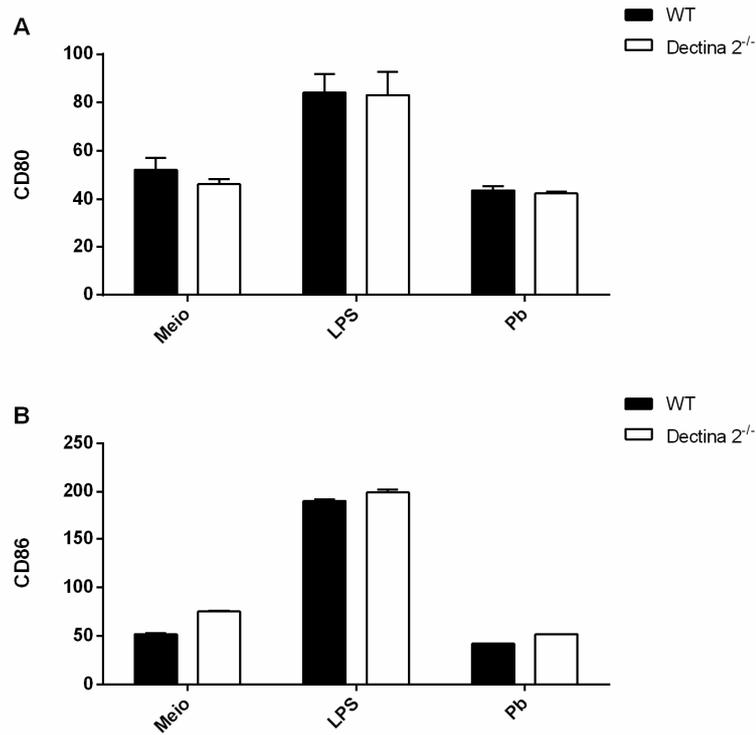
Uma vez que foi observada redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias por BMDCs e BMDMs deficientes de Dectina-2 infectados por *P. brasiliensis*, além de ser detectada uma diminuição da ativação desses macrófagos, fez-se necessário avaliar a ativação da resposta imune adaptativa decorrente na ausência do receptor. Também foi relevante dar continuidade à pesquisa com Dectina-3, já que os resultados com BMDCs e BMDMs mostraram-se divergentes.

Inicialmente, foi avaliada a atividade co-estimulatória de BMDCs selvagens ou deficientes de Dectina-2 ou Dectina-3, infectadas pelo fungo, por meio da quantificação das moléculas CD80 e CD86 expressas em cada tipo celular (Figuras 21 e 23).

Todas as BMDCs, sem prévio estímulo, ou infectadas pelo fungo, não apresentaram diferença na expressão dessas moléculas. Por esta razão, também não foi possível observar diferença na expressão de CD80 e CD86 por células selvagens e deficientes de Dectina-2 ou Dectina-3 (Figuras 21 e 23).

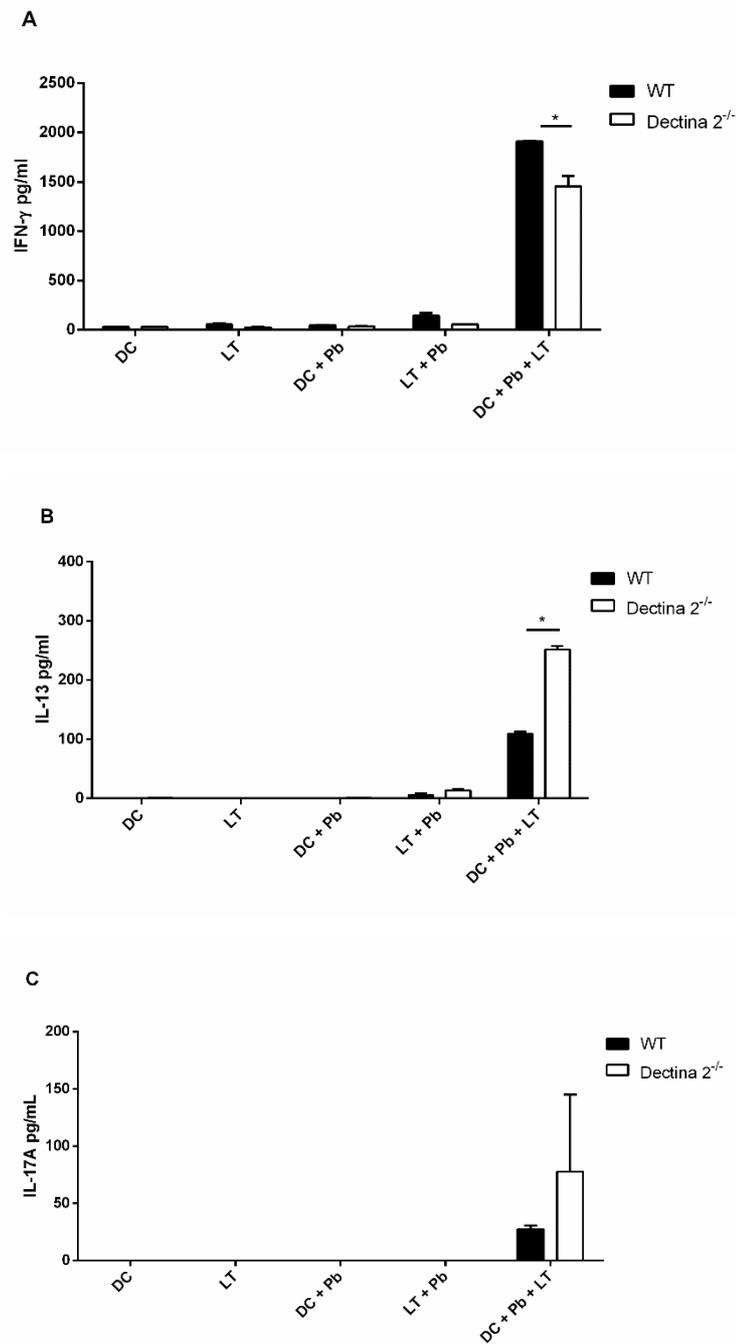
Dessa forma, para analisar a ativação de uma resposta imune adaptativa *in vitro*, foi analisada também a secreção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-17A) por linfócitos T derivados de esplenócitos de camundongos selvagens co-cultivados com BMDCs selvagens ou deficientes de Dectina-2 (Fig. 22).

Linfócitos T cultivados com células dendríticas infectadas e deficientes de Dectina-2 apresentaram uma secreção significativamente menor de IFN- $\gamma$  (Fig. 22A) e maior de IL-13 (Fig. 22B) em comparação com os cultivados com as selvagens. Não houve diferença significativa entre a produção de IL-17A por linfócitos T cultivados com BMDCs selvagens e deficientes do receptor (Fig. 22C). Sendo assim, Dectina-2 mostra-se necessária para a indução de uma resposta do tipo Th1 exercida por linfócitos T, *in vitro*.



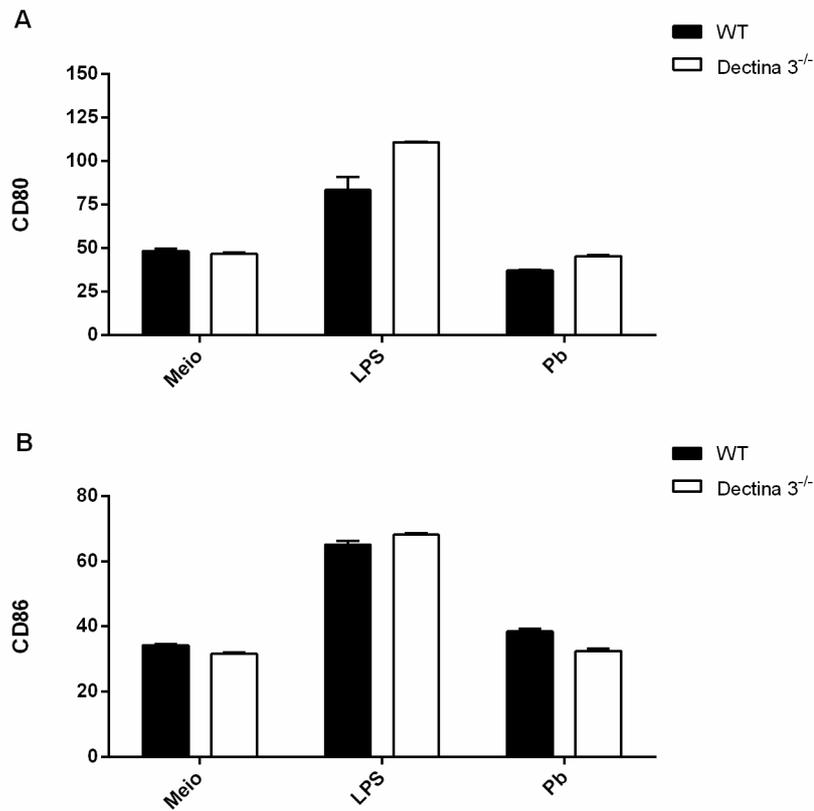
**Figura 23. Expressão de moléculas co-estimulatórias por BMDCs selvagens e deficientes de Dectina-2 infectadas por *P. brasiliensis*.**

BMDCs selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 (Dectina-2<sup>-/-</sup>) foram infectadas por *P. brasiliensis* (Pb18) (MOI 2:1). Após 24 horas de estímulo, a quantificação das moléculas co-estimulatórias CD80 (A) e CD86 (B) foi realizada por citometria de fluxo. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimento conduzido em triplicata.



**Figura 24. Dectina-2 contribui para a indução de resposta Th1 *in vitro*. Avaliação da secreção de IFN- $\gamma$**

(A), IL-13 (B) e IL-17A (C) por linfócitos T (LT) derivados do baço de camundongos selvagens co-cultivados com BMDCs (DC) de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) (MOI 2:1). \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes conduzidos em triplicata.



**Figura 25. Expressão de moléculas co-estimulatórias por BMDCs selvagens e deficientes de Dectina-3 infectadas por *P. brasiliensis*.**

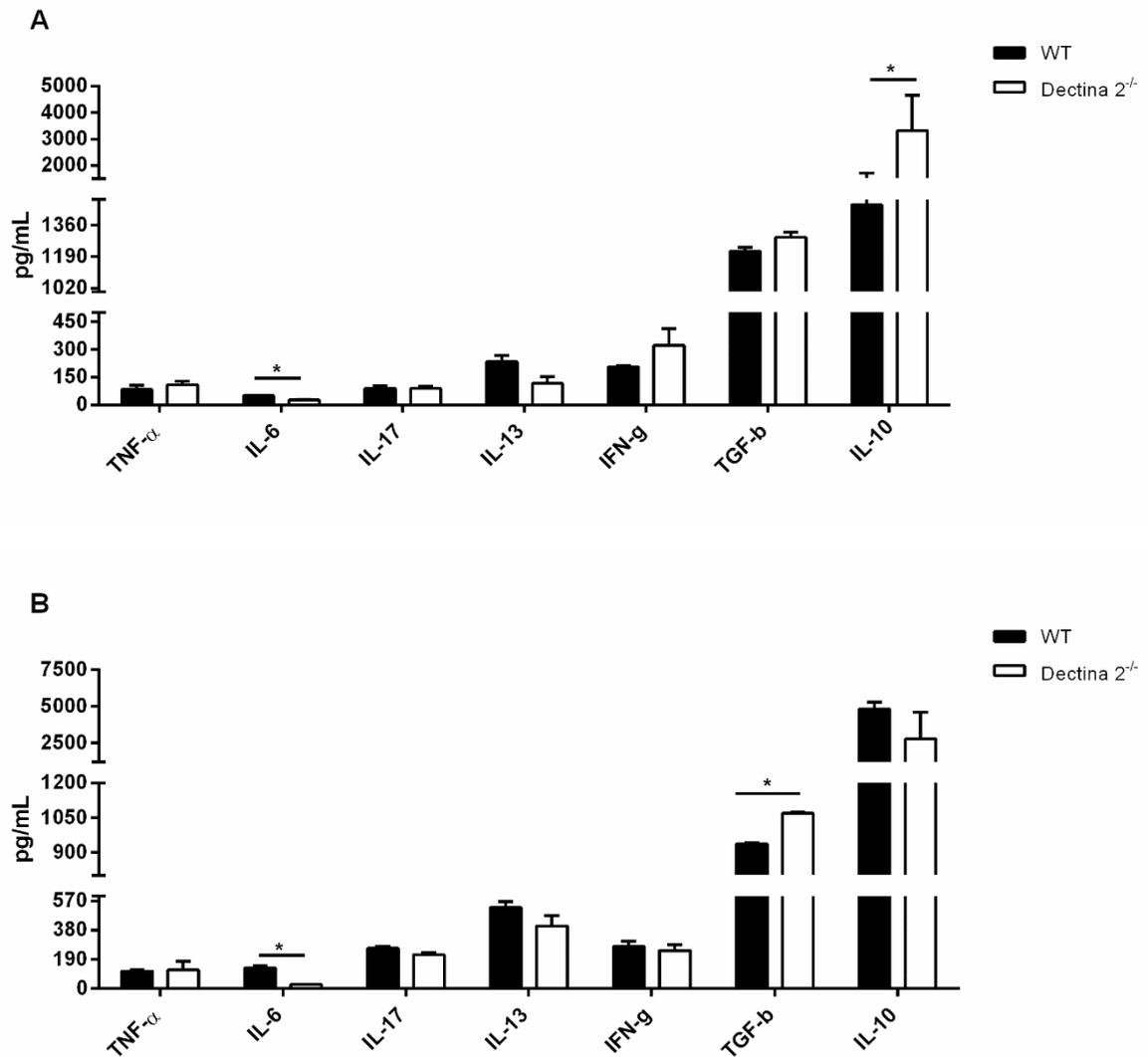
BMDCs selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-3 (Dectina-3<sup>-/-</sup>) foram infectadas por *P. brasiliensis* (Pb18) (MOI 2:1). Após 24 horas de estímulo, a quantificação das moléculas co-estimulatórias CD80 (A) e CD86 (B) foi realizada por citometria de fluxo. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimento conduzido em triplicata.

### **5.7 O controle da infecção por *P. brasiliensis* em camundongos é parcialmente dependente de Dectina-2.**

Até o momento, os resultados observados corroboraram para atestar a importância de Dectina-2 no reconhecimento de *P. brasiliensis* e na ativação de uma resposta imune eficaz contra o fungo. Posto isso, fez-se necessário um estudo dessa resposta em modelos de infecção *in vivo* para se confirmar tal função.

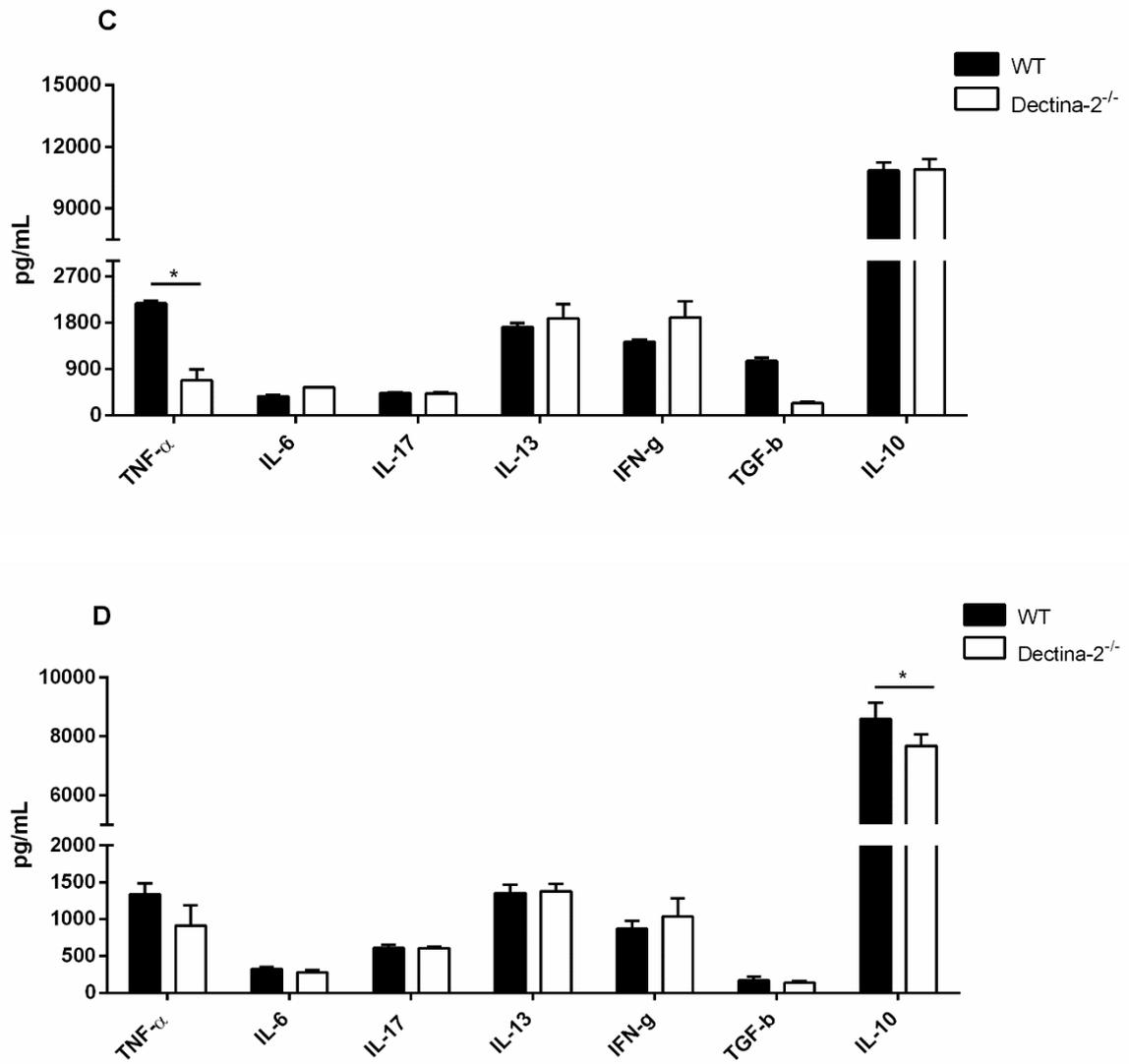
Para isso, camundongos selvagens e deficientes de Dectina-2 foram infectados com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) por via endovenosa. Após 30 e 60 dias de infecção, pulmões e fígados foram coletados para análise de citocinas (Fig. 24) e carga fúngica tecidual (Fig. 25). Além disso, parte dos pulmões foram fixados para análises histopatológicas (Fig. 26). Tal ensaio não foi realizado com camundongos deficientes de Dectina-3 por não ter sido detectada diferença na sobrevivência dos animais deficientes desse receptor.

Em 30 dias de infecção, os animais deficientes de Dectina-2 apresentaram uma quantidade menor de IL-6 no pulmão (Fig. 24A) e TNF- $\alpha$  no fígado (Fig. 24C), enquanto os níveis de IL-10 foram aumentados no pulmão, em relação ao controle (Fig. 24A). Não houve diferença significativa das demais citocinas avaliadas nesse período (Fig. 24A e 24C). Após 60 dias de infecção, os camundongos produziram ainda menor quantidade de IL-6 no pulmão, em comparação com os selvagens e maior produção de TGF- $\beta$  (Fig. 24B) e, no fígado, menor produção de IL-10 (Fig. 24D).



**Figura 26. Secreção de citocinas no pulmão e fígado de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por *P. brasiliensis*.**

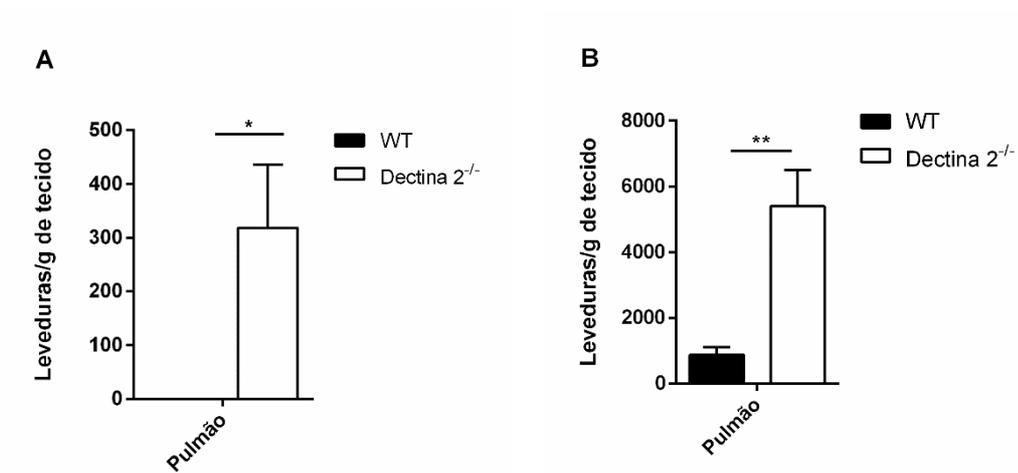
Avaliação da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10 em pulmão (A e B) e fígado (C e D) de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2. Os animais foram infectados via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (Pb 18) e sacrificados com 30 (A e C) e 60 (B e D) dias após a infecção para coleta dos órgãos e posterior análise. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio de triplicatas biológicas.



**Figura 27. Secreção de citocinas no pulmão e fígado de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por *P. brasiliensis*.**

Avaliação da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10 em pulmão (A e B) e fígado (C e D) de camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2. Os animais foram infectados via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (Pb 18) e sacrificados com 30 (A e C) e 60 (B e D) dias após a infecção para coleta dos órgãos e posterior análise. \*  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio de triplicatas biológicas.

Em relação à carga fúngica pulmonar, os animais deficientes de Dectina-2 apresentaram maior número de leveduras recuperadas em comparação com os selvagens, em ambos os tempos avaliados (Fig. 25). No fígado, foi observada apenas uma colônia de leveduras nos animais deficientes, em 30 e 60 dias de infecção, não sendo observada nenhuma colônia naqueles selvagens.



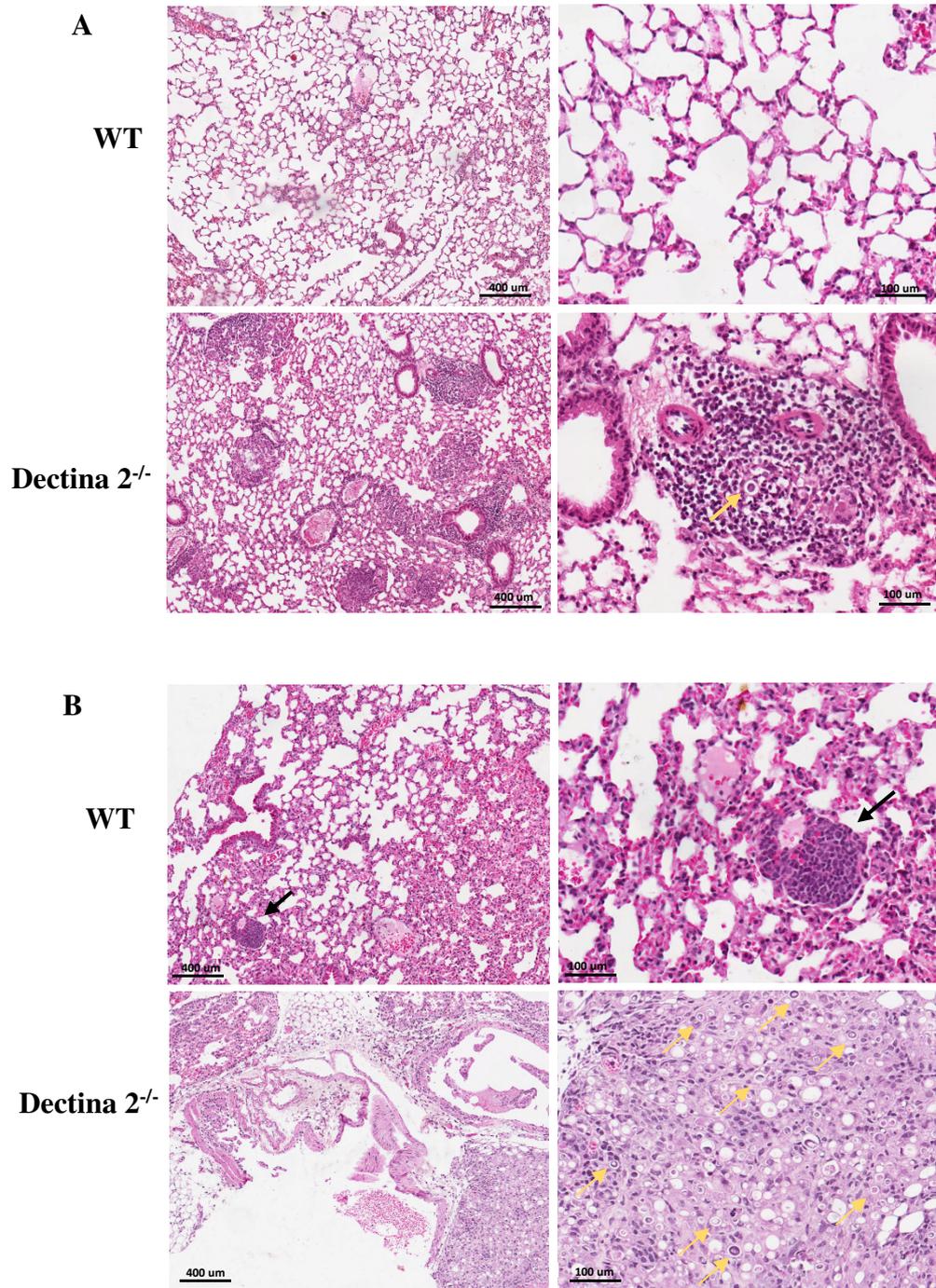
**Figura 28.** Carga fúngica no pulmão de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por *P. brasiliensis*.

Camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 foram infectados por via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (Pb 18) e sacrificados para coleta de pulmão e fígado com 30 (A) e 60 (B) dias após a infecção, para a determinação do número de leveduras recuperadas por grama de tecido. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas.

As análises histopatológicas realizadas mostraram uma maior área de lesão dos pulmões de camundongos deficientes de Dectina-2 em 30 (Fig. 26A) e 60 (Fig. 26B) dias de infecção, com mais infiltrados celulares na região dos alvéolos pulmonares e ausência de granulomas compactos. Estruturas semelhantes a granulomas apresentaram uma distribuição celular difusa incapaz de conter o fungo. Além disso, é possível observar uma grande quantidade de leveduras no tecido, em 60 dias após a infecção dos animais (Fig. 26B), corroborando com os resultados da carga fúngica pulmonar.

Em 30 dias de infecção, pulmões de camundongos selvagens apresentaram baixa inflamação e não houve detecção de granulomas compactos (Fig. 26A). No entanto, após 60 dias de infecção, houve um aumento dos infiltrados celulares para a contenção dos fungos (Fig. 26B).

Dessa maneira, além de uma resposta imune protetora *in vitro*, Dectina-2 parece ser responsável por induzir uma resposta protetora também em camundongos infectados por *P. brasiliensis*.



**Figura 29.** Análise histopatológica de pulmão de camundongos deficientes de Dectina-2 infectados por *P. brasiliensis*.

Camundongos selvagens (WT) ou deficientes de Dectina-2 foram infectados por via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* (Pb 18) e sacrificados para coleta de pulmão com 30 (A) e 60 (B) dias após a infecção, para análises histopatológicas. Cortes de  $5 \mu\text{m}$  foram corados com H & E, e analisados por microscopia de luz. As setas alaranjadas apontam para os fungos presentes e as setas pretas, para granulomas nos campos analisados. As figuras mostradas na coluna da esquerda estão em aumento de 10x e, as da direita, de 40x.

## 6 DISCUSSÃO

---

“É na adversidade que se prova ter paciência e amor.”  
(Santa Catarina de Sena)

Para a realização deste estudo, inicialmente, buscou-se confirmar a maior relevância de CLR, em comparação com TLR, no reconhecimento de *P. brasiliensis*, uma vez que esses receptores já foram relacionados com a indução de resposta imune protetora contra fungos (HARDISON; BROWN, 2012). A Figura 9A atestou a importância de CLR dependentes de SyK – e não TLR – na indução do sinal intracelular e na consequente produção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*.

Em conformidade com tal resultado, macrófagos selvagens e deficientes de MyD88, previamente tratados com laminarina (molécula que bloqueia a indução de sinal a partir de sua ligação com Dectina-1) e infectados pelo mesmo fungo, não apresentaram diminuição da produção de TNF- $\alpha$  sugerindo que os TLRs não participariam no reconhecimento das leveduras (GONZALEZ et al., 2008). No entanto, já foi demonstrada uma possível ação sinérgica entre TLR-4, MR e Dectina-1 em células dendríticas diante de uma infecção por *P. brasiliensis*, induzindo uma proliferação de linfócitos Th17 e Tc17 (LOURES et al., 2015).

Ademais, em outro tipo celular, estudos com monócitos humanos relacionaram a interação de gp43 da parede celular do fungo com TLR2, TLR4 e MR, evidenciando seus possíveis efeitos na resposta imune inata (NAKAIRA-TAKAHAGI et al., 2011). As células previamente tratadas com anti-TLR2, anti-TLR-4 e anti-MR e ativadas pela glicoproteína produziram quantidades significativamente menores de IL-10, enquanto apenas aquelas previamente tratadas com anti-TLR4 e anti-MR produziram menores concentrações de TNF- $\alpha$ , o que demonstrou a importância de TLRs na produção de duas citocinas: uma pró-inflamatória e outra reguladora. Contudo, tal função só foi possível pela sua associação com um CLR – Receptor de Manose –, ainda que na ausência de SyK (NAKAIRA-TAKAHAGI et al., 2011).

Alternativamente, um estudo com camundongos deficientes de MyD88 e infectados por *P. brasiliensis* por via endovenosa revelou que os TLRs parecem realmente não possuir a mesma relevância na indução de resposta imune protetora contra o fungo (GONZALEZ et al., 2008). Esses animais apresentaram carga fúngica semelhante nos pulmões, baço e fígado em comparação com os selvagens, assim como níveis equivalentes de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , MIP-2, IFN- $\gamma$ , e IL-4 nos aludidos órgãos (GONZALEZ et al., 2008). Dessa forma, o papel

dos TLRs na infecção por *P. brasiliensis* permanece controverso na literatura uma vez que, enquanto TLR3 parece desempenhar uma importante função no mecanismo de escape do fungo (JANNUZZI et al., 2019), TLR2 e TLR4 exercem função protetora diante da infecção (CALISH et al., 2008; NAKAIRA-TAKAHAGI et al., 2011). TLR9 também executa uma função protetora na paracoccidiodomicose, uma vez que sua ativação evitaria uma resposta inflamatória tecidual (associada a neutrófilos) exacerbada (MENINO et al., 2013).

Mesmo com estudos que evidenciam o importante papel de diferentes CLR's na infecção contra *P. brasiliensis*, e apesar de já ter sido comprovado que Dectina-2 reconhece o fungo (MCGREAL et al., 2006), até então não se tinha uma definição clara de sua função na resposta imune induzida a partir de sua ligação. As figuras 9B e 9C, todavia, já demonstram claramente a relevância do receptor na produção de TNF- $\alpha$  por BMDCs infectadas pelo fungo.

Dectina-1, por sua vez, já possui um papel bem estabelecido na imunidade direcionada a fungos, por se ligar especificamente à  $\beta$ -glucanas expostas em suas paredes celulares (BROWN, 2011; HARDISON; BROWN, 2012). Tal receptor exerce função protetora contra *Pneumocystis carinii*, *C. albicans*; *A. fumigatus*, entre outros, por diferentes mecanismos de ação, seja por induzir uma resposta inflamatória com produção de citocinas, como TNF- $\alpha$ , ou por suscitar atividade efetora de macrófagos, como, por exemplo, produção de NO (ESTEBAN et al., 2011; SAIJO; IWAKURA, 2011).

Nesse contexto, Dectina-1 também já foi associado à indução de resposta imune protetora na infecção de modelos experimentais por *P. brasiliensis*. Um estudo sugere que Dectina-1, além de induzir a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , também apresenta uma ação sinérgica com o complexo inflamassoma NLRP3, com consequente produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 por macrófagos murinos infectados pelo fungo, suscitando uma ativação de resposta Th1/Th17 (FERIOTTI et al., 2015). De forma semelhante, o bloqueio do receptor em monócitos humanos infectados com uma cepa menos virulenta de *P. brasiliensis* (Pb 265) induziu uma menor secreção das citocinas IL-12, IL-17, IL-10 e TNF- $\alpha$ , possivelmente pelo fato de Pb 265 apresentar maior exposição de  $\beta$ -1,3 glucana, ligante de Dectina-1, em sua superfície (ROMAGNOLO et al., 2018). Ainda, animais deficientes do receptor e infectados pelo fungo, quando comparados aos selvagens, apresentaram aumento dos índices de mortalidade e patologia tecidual, diminuição de citocinas relacionadas aos perfis Th1, Th2 e Th17, diminuição da ativação e migração dessas células para o sítio de infecção, além do aumento da expansão de células T regulatórias (LOURES et al., 2014).

Uma vez confirmada a relevância de CLR's na secreção de TNF- $\alpha$  por BMDCs e a significativa diferença naquelas deficientes de Dectina-2 e Dectina-3 – mesmo com respostas

opostas entre si – em 24 horas de estímulo por *P. brasiliensis*, a susceptibilidade de camundongos deficientes desses receptores diante de uma infecção pelo fungo foi avaliada (Fig 10). Tais resultados evidenciaram que, apesar de BMDCs deficientes de Dectina-3 secretarem maior quantidade de TNF- $\alpha$  em comparação com o controle, a sobrevivência dos animais deficientes não foi diferente significativamente daquela dos selvagens. Já camundongos deficientes de Dectina-2 apresentaram uma queda significativa de sobrevivência quando infectados por *P. brasiliensis*. Da mesma forma, em estudos prévios, Dectina-2 já demonstrou desempenhar um papel protetor de animais na resposta imune inata diante de infecções por fungos, como, por exemplo, por *Candida* sp. (IFRIM et al., 2014; IFRIM et al., 2016) e *Pneumocystis pneumonia* (KOTTOM et al., 2017).

Dessa forma, outros experimentos em modelos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para melhor entender possíveis mecanismos para os efeitos observados. Nesse sentido, a cinética da secreção de outras citocinas e de quimiocina por BMDCs e BMDMs deficientes de cada receptor e infectadas por *P. brasiliensis* também foi verificada. Uma menor produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 encontrada em BMDCs derivadas de camundongos deficientes de Dectina-2 (Fig. 11A), em 6 e 24 horas após a infecção, sugere sua grande relevância para a síntese dessas citocinas já nas primeiras horas após a infecção. Essa secreção inicial de citocinas pró-inflamatórias sugere um possível papel protetor diante de uma infecção pelo fungo (CALICH; KASHINO, 1998).

Juntamente com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  é conhecido por promover resistência a seres humanos e camundongos diante de uma infecção por *P. brasiliensis* (CALICH; KASHINO, 1998; CARMO et al., 2006). Sua produção já foi relacionada com a ativação de macrófagos, formação de granulomas, controle da disseminação fúngica em pulmões de camundongos infectados, produção de Óxido Nítrico e citocinas, além da indução da proliferação de linfócitos T murinos (SOUTO et al., 2000). Em estudo com células humanas, o pré-tratamento de macrófagos derivados de monócitos com TNF- $\alpha$  – e não com IFN- $\gamma$  – foi responsável por induzir a atividade fungicida destas, por mecanismo dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Peróxido de Hidrogênio*) (CARMO et al., 2006).

Até o momento, em modelos *in vitro*, Dectina-2 e Dectina-3 foram estudados na infecção por *P. brasiliensis*, manifestando um papel relevante no reconhecimento do fungo por células dendríticas plasmocitóides humanas, sendo importantes na sua atividade fagocítica e na produção de TNF- $\alpha$  (PREITE et al., 2018). No entanto, no presente estudo, Dectina-3 parece desempenhar uma função contraditória em BMDCs, uma vez que sua ausência aumenta, de certa forma, a secreção dessa citocina (Fig. 12A e 14A).

Por outro lado, a secreção de TNF- $\alpha$  parece ser dependente de ambos os receptores, Dectina-1 e Dectina-2, porém de forma independente. A Figura 13A indica que o bloqueio dos dois receptores concomitantemente não interfere na sua já diminuída secreção em comparação à situação na qual ambos são bloqueados separadamente. Como mencionado, vários estudos ratificam o importante papel de Dectina-1 na indução da produção da referida citocina diante de uma infecção por *P. brasiliensis* (ROMAGNOLO et al., 2017; LOURES et al., 2015) mas, até o momento, só um estudo relacionou a importância de Dectina-2 para o estabelecimento de tal efeito, apenas em células plasmocitóides humanas (PREITE et al., 2018).

Ao contrário do que se observou para as células dendríticas plasmocitóides (PREITE et al., 2018), BMDCs murinas deficientes de Dectina-2 secretaram menores quantidades de IL-6 em comparação com as selvagens em ambos os tempos observados (Fig. 11A). Tal produção não se deveu a uma possível associação com Dectina-1, apesar de ser verificado que, novamente, ambos os receptores exercem essa importante função separadamente (Fig 13D). Assim, um e outro teriam papel fundamental no controle da disseminação fúngica, uma vez que já foi constatado que IL-6 juntamente com IL-23 estão envolvidas na modulação da resposta imune e formação de granuloma durante a infecção por *P. brasiliensis* (TRISTÃO et al., 2017).

Estudos anteriores demonstraram um mesmo padrão de resposta na indução de citocinas por fagócitos deficientes de Dectina-2. Células dendríticas de camundongos deficientes do receptor, induzidas por mananas de *C. albicans*, apresentaram uma menor produção de IL-12p40, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 em comparação com o controle (SAIJO et al., 2010). Em concordância com tais resultados, em um diferente modelo experimental, macrófagos alveolares derivados de camundongos deficientes de Dectina-2 apresentaram uma diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, devido a uma fosforilação significativamente menor de Syk após a infecção por componentes da parede celular de *P. pneumonia* (KOTTOM et al., 2017), apresentando um possível mecanismo para tal efeito.

A presente pesquisa aponta que após 24 horas de estímulo, também houve uma diminuição na secreção de IL-10 e IL-1 $\beta$  por BMDCs deficientes de Dectina-2 (Fig. 11A, Fig. 13B e 13C), revelando, dessa forma, um papel importante desse receptor tanto na produção de citocinas pró-inflamatórias necessárias para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, quanto para a regulação dessa resposta e proteção contra o *P. brasiliensis*.

Com efeito, já foi comprovada a ativação do complexo inflamassoma NLRP3 e sua função em induzir uma resposta imune protetora contra o fungo, uma vez que a presença de IL-1 $\beta$  possibilita a ativação de macrófagos murinos e sua eliminação (TAVARES et al., 2013). Além disso, IL-1 $\beta$  e IL-18 promovem resistência a camundongos infectados por *P. brasiliensis*,

induzindo uma resposta de perfil Th1/Th17, com diminuição da carga fúngica pulmonar e mortalidade, ratificando a importância do complexo inflamassoma NLRP3 em conferir proteção diante de uma infecção pelo fungo (FERIOTTI et al., 2017; KETELUT-CARNEIRO et al., 2015).

A importância de Dectina-1 para a ativação de NLRP3 e secreção de IL-1 $\beta$  já foi também demonstrada (KETELUT-CARNEIRO et al., 2018). Contudo, a Figura 13B estabelece um papel mais importante de Dectina-2 em induzir a secreção de tal citocina. De forma consoante, constatou-se recentemente que Dectina-2 atua como receptor primário para a ativação do complexo inflamassoma NLRP3 em resposta à infecção por *H. capsulatum*, favorecendo a produção de IL-1 $\beta$  por células dendríticas (CHANG et al., 2017) e confirmando seu papel na ativação da resposta imune inata diante da infecção por outros fungos.

Dectina-3, por sua vez, apresentou um papel controverso na síntese dessas citocinas e quimiocina *in vitro* diante de uma infecção por *P. brasiliensis*, já que, na sua ausência, a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 aumentou significativamente em comparação ao controle. Desta maneira, é possível que, na ausência do receptor, outros PRRs estejam envolvidos na indução da resposta observada. Em outro modelo de infecção, a falta do receptor não alterou a produção de TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-27, IL-12p70, IL-10, IL-4 e IL-5 nos pulmões de camundongos infectados por *Cryptococcus neoformans*, tampouco nos sobrenadantes de cultura avaliados (CAMPUZANO et al., 2017).

Em contraposição a esses resultados, BMDMs pré-tratados com anticorpos anti-Dectina-3 ou anti-Dectina-2 e infectados por hifas de *C. albicans* apresentaram um bloqueio na translocação de NF- $\kappa$ B (sub-unidade p65) para o núcleo, com consequente diminuição da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 e IL-10 (ZHU et al., 2013). Considerando tais resultados discordantes, a indução da produção de citocinas dependente de Dectina-3 parece estar relacionada à disponibilidade de ligantes na parede celular dos diferentes fungos.

Diante de uma associação conhecida de Mincle e Dectina-3 no reconhecimento de PAMPs (MIYAKE; MASATSUGU; YAMASAKI, 2015), foram realizadas, no presente estudo, infecções de BMDCs que apresentavam esses receptores de forma combinada. Entretanto, não foi possível estabelecer tal função diante da infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que apenas a ausência de Dectina-3 aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos sobrenadantes de cultura coletados (Fig. 14).

Diferentemente de outras citocinas estudadas, a secreção de IL-10 mostrou ser dependente de Dectina-1, Dectina-2 e Mincle, mas não de Dectina-3. Pode-se inferir, dessa forma, que a ligação com diferentes PAMPs de natureza glicídica – uma vez que Dectina-3 não

reconhece carboidratos (SANCHO; SOUZA, 2012) – levaria a uma ativação de sinal, provavelmente dependente de SyK, para a sua produção. E, ainda que a ausência de IL-10 já tenha sido relacionada a uma maior resistência de camundongos infectados por *P. brasiliensis* (COSTA et al., 2013), uma imunorregulação desencadeada por células produtoras da citocina é essencial para o controle de respostas inflamatórias exacerbadas nas infecções fúngicas (ROMANI; PUC CETTI, 2006).

Diante de todo o exposto, Dectina-2, e não Dectina-3, parece possuir um papel importante tanto na produção de citocinas pró-inflamatórias necessárias para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, quanto para a regulação dessa resposta e proteção contra o *P. brasiliensis*.

É sabido que a via principal de infecção pelo fungo é inalatória e, dessa forma, macrófagos alveolares são fundamentais para a resposta imune inicial do hospedeiro. Após o reconhecimento inicial, essas células são capazes de transportar peptídeos antigênicos derivados do fungo para os linfonodos e, assim, estimular uma resposta imune adaptativa específica (CALICH et al., 2008). Dessa maneira, uma ativação inicial de macrófagos é essencial para o controle da infecção.

Macrófagos deficientes de Dectina-2 apresentaram uma porcentagem significativamente mais baixa de fagocitose/interação em comparação com os selvagens, ratificando a importância do receptor na atividade fagocítica da célula (Fig. 15A). O número de fungos fagocitados por célula é significativamente menor nos macrófagos deficientes de Dectina-2 (Fig. 15B). Isso sinaliza uma menor ativação das células desse grupo ou, até mesmo, uma maior susceptibilidade de macrófagos não ativados, uma vez que o número de UFCs recuperadas de macrófagos deficientes do receptor foi significativamente maior do que daqueles selvagens, tanto em 24, como em 48 horas após a infecção (Fig. 16). Tais resultados confirmam um papel de Dectina-2 na atividade fungicida dessas células. Na figura 16 também é possível observar que o número de UFCs cresceu em 24 horas em ambos os grupos, indicando a capacidade do fungo de sobreviver e de se replicar tanto em macrófagos selvagens não ativados – uma vez que ele é um patógeno intracelular facultativo (BRUMMER et al., 1989) – como naqueles deficientes do receptor.

Por sua vez, macrófagos deficientes de Dectina-3 apresentaram uma resposta diferente, uma vez que não houve diminuição da capacidade fagocítica (Fig. 18) e nem fungicida (Fig. 19) da célula em 24 horas de infecção. Contudo, após 48 horas, o número de leveduras viáveis recuperadas foi ainda menor no grupo de células deficientes (Fig. 19), o que poderia ser

explicado por diferentes mecanismos de defesa, como a presença de NO, presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma maior acidificação do fagolisossomo (CAMPOS et al., 2005).

O estresse oxidativo, caracterizado por um aumento de agentes oxidantes, como NO e ROS, proporciona uma linha de defesa das células efectoras contra os micro-organismos (HAMPTON et al., 1998). Posto isso, a produção de NO desencadeada pela ligação de PAMPs ou DAMPs em PRRs por macrófagos ativados usualmente é necessária para o controle da infecção por *P. brasiliensis*, fazendo com que o bloqueio de sua produção seja um importante mecanismo de escape do fungo (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017).

Nesse sentido, sua glicoproteína gp43 já foi estudada pela capacidade de inibir a produção de NO assim como de diminuir a capacidade fungicida de macrófagos estimulados por citocinas (POPI; LOPES; MARIANO, 2002). Além disso, outro mecanismo de escape importante já foi verificado, uma vez que genes encontrados em *P. brasiliensis* codificam proteínas que interferem na atividade da NADPH oxidase e convertem espécies reativas de oxigênio em formas menos tóxicas (FELIPE et al., 2005; TAVARES et al., 2007; TAMAYO et al., 2016).

Além de aparentemente resultar em uma maior indução de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , a produção de NO por macrófagos também estaria relacionada com o bloqueio da transformação de conídios de *P. brasiliensis* em leveduras. Assim, tal resposta proporcionaria uma defesa do organismo contra o estabelecimento da infecção (GONZALES et al., 2000).

De modo geral, a baixa secreção de NO por BMDMs infectadas pelo fungo mostrada nas Figuras 17 e 20 sugere que a atividade fungicida dessas células estaria pouco relacionada com o referido mecanismo. Mesmo assim, as células deficientes de Dectina-2 apresentaram ainda mais baixos níveis da molécula em comparação com aquelas selvagens. Cumpre salientar que, TAVARES e colaboradores (2013), de forma semelhante, sugeriram que a ativação do inflamassoma NLRP3 e a sinalização desencadeada pela ligação de IL-1 $\beta$  com seu receptor exerce ativação do efeito microbicida de macrófagos contra *P. brasiliensis* independentemente de NO.

Em 2008, CALICH e colaboradores verificaram que a interação de TLR-4 com *P. brasiliensis* é capaz de ativar macrófagos e aumentar a produção de IL-12, NO e MCP-1, aumentando também sua atividade fagocítica. No entanto, essa ativação não foi associada com uma diminuição de UFC recuperadas dessas células. Consequentemente, sua atividade fungicida não estava propriamente relacionada com sua capacidade fagocítica. Além disso, macrófagos peritoneais de camundongos resistentes à infecção pelo fungo secretaram baixos níveis de NO e altos níveis de TNF- $\alpha$ , ocorrendo o oposto com aqueles susceptíveis, indicando

que o óxido nítrico estaria inibindo, de alguma forma, a secreção dessa citocina. Ainda em conformidade com esses resultados, estudos posteriores demonstraram que a produção de NO dependente da ligação de TLR-2 com frações de lipídios de *P. brasiliensis* inibe a produção de IL-12, IL-10 e GM-CSF e controla a ativação de macrófagos (LOURES et al., 2012).

Outros estudos apresentaram papéis controversos da molécula na infecção pelo fungo, uma vez que camundongos infectados e tratados diariamente com um bloqueador da síntese de NO tiveram uma menor supressão da resposta linfoproliferativa de células do baço e um menor dano pulmonar em comparação com o controle, apesar de também apresentarem maior carga fúngica no órgão (BOCCA et al., 1998). Em um diferente estudo, macrófagos provenientes de camundongos susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* (B10.A) produziram maiores e persistentes níveis de NO em comparação com os resistentes (A/Sn). Além disso, nos animais resistentes, houve uma maior produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados pelo fungo (NASCIMENTO et al., 2002).

Tal resposta parece estar relacionada com um possível bloqueio da produção de TNF- $\alpha$  exercido pelo óxido nítrico, uma vez que o tratamento de macrófagos de camundongos B10.A, que não apresentavam produção da citocina, com Sulfato de Aminoguanidina (inibidor da NO sintase), possibilitou a produção de TNF- $\alpha$  por essas células (NASCIMENTO et al., 2002). Desta forma, em consonância com os resultados apresentados no presente estudo, TNF- $\alpha$ , e não NO, está relacionado com uma resposta imune eficaz diante de uma infecção por *P. brasiliensis*.

Nosso grupo avaliou também a acidificação dos fagolisossomos em BMDMs (não ativadas) selvagens e deficientes de Dectina-2 e Dectina-3, uma vez que tal mecanismo, em conjunto com a produção de ROS, é relevante para a eliminação do fungo (CAMPOS et al., 2005). Apesar de não ter havido diferença entre a acidificação de macrófagos selvagens e deficientes dos receptores infectados por *P. brasiliensis* não se pode afirmar com esses resultados que Dectina-2 e Dectina-3 não interfeririam nesse processo. Experimentos realizados com prévio estímulo (com IFN- $\gamma$ , por exemplo) das células poderiam resultar em uma possível diferença, uma vez que fagócitos não ativados apresentam deficiência em eliminar o fungo (BRUMMER et al., 1989; MOSCARDI-BACCHI et al., 1994).

Resultados prévios demonstraram que, apesar de ser importante para a atividade fungicida de BMDMs infectadas por *P. brasiliensis*, a acidificação de fagolisossomos seria menos eficiente do que a produção de NO para esse fim. Nesse estudo, macrófagos previamente estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com Bafilomicina A1 (molécula que bloqueia a acidificação do fagolisossomo) ou Aminoguanidina apresentaram diferentes quantidades de leveduras recuperadas após infecção pelo fungo. A leveduras foram capazes de se replicar com

maior intensidade nas células infectadas previamente tratadas com Aminoguanidina em comparação com aquelas tratadas com Bafilomicina A1 ou sem tratamento prévio (SILVA, 2018).

Posto isso, novos estudos deverão ser conduzidos para se investigar a relevância dos receptores Dectina-2 e Dectina-3 nos mecanismos efetores de eliminação de *P. brasiliensis* – como a produção de NO, a produção de ROS e a acidificação de fagolisossomos – em macrófagos. Ainda, tais estudos deverão ser realizados com estimulação prévia das células, a fim de se obter uma análise mais fidedigna.

Para dar continuidade à investigação dos papéis desses receptores na resposta imune diante de uma infecção pelo fungo, fez-se necessário o estudo da ativação de uma possível resposta adaptativa induzida a partir da ligação desses CLRs, principalmente Dectina-2, com *P. brasiliensis*. E, uma vez que células dendríticas são as células mais efetivas para a apresentação de antígeno aos linfócitos T (CELLA et al., 1997), a expressão de moléculas coestimulatórias em BMDCs também foi verificada.

Como esperado, as células não estimuladas e infectadas pelo fungo apresentaram uma expressão de CD80 e CD86 semelhante àquelas não infectadas, independentemente de possuírem ou não Dectina-2 ou Dectina-3. Um estudo prévio comprovou que, tanto a infecção por *P. brasiliensis*, como a presença da glicoproteína gp43 do fungo foram capazes de diminuir a expressão de MHC-II, CD80, CD86, CD54 e CD40, mesmo nas células previamente estimuladas com LPS (FERREIRA et al., 2004). Dessa maneira, também não foi possível verificar diferença na expressão de CD80 e nem de CD86 nas células que possuíam ou não os receptores investigados (Fig 21 e 23).

Mesmo assim, uma maior produção de IL-13 somada a uma menor secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T cultivados com BMDCs deficientes de Dectina-2 foi observada (Fig. 22A e 22B). Tal resultado sugere a tendência dessas células a induzirem uma resposta direcionada ao perfil Th2 contra o *P. brasiliensis*, não sendo esta considerada capaz de controlar a infecção (MARQUES; SILVA-VERGARA; RODRIGUES, 2002). Como já mencionado, o perfil de resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , é conhecido na literatura por promover proteção contra o fungo, enquanto um perfil Th2 seria responsável por gerar susceptibilidade a camundongos isogênicos (BOCCA et al., 2013; KARHAWI; COLOMBO; SALOMÃO, 2000).

Da mesma maneira, estudos com seres humanos comprovaram que linfócitos de pacientes com as formas aguda e crônica da doença, estimulados com antígenos de *P. brasiliensis*, produziram significativamente menor quantidade de IFN- $\gamma$  e IL-2 e maior de IL-10 em comparação com aqueles clinicamente curados (BENARD et al., 2001). Analisando

citocinas e fatores de transcrição específicos de cada resposta em PBMCs, verificou-se que pacientes com a forma assintomática da PCM apresentaram um perfil de resposta Th1, enquanto aqueles mais susceptíveis apresentaram um perfil misturado de Th2/Th9 (CASTRO et al., 2013).

Em vista disso, uma menor produção de IFN- $\gamma$  ocasionaria menor ativação de macrófagos, gerando assim, menor atividade fagocítica e fungicida, como observado em resultados anteriores (Fig. 16, 17 e 18). Neste sentido, Dectina-2 demonstra ser importante para a indução de uma resposta imune adaptativa protetora contra *P. brasiliensis* em modelo de infecção *in vitro*.

De outro modo, linfócitos T cultivados com BMDCs deficientes de Dectina-2 não apresentaram produção significativamente diferente de IL-17A daqueles cultivados com as selvagens (Fig. 22C), indicando não ocorrer distinção no perfil de resposta Th17 nos dois grupos. Uma possível explicação para tal resultado é que, apesar de ocorrer menor secreção de IL-6 e IL-1 $\beta$  por BMDCs deficientes para Dectina-2, não foi observada secreção de IL-23 – citocina também relacionada com a indução do perfil Th17 – por nenhum grupo.

Assim, essas citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23) podem ser responsáveis por ocasionar tal resposta visto que, em um diferente modelo experimental, células TCD4<sup>+</sup> estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28, na presença de meio condicionado gerado a partir da cultura de BMDCs deficientes de Dectina-2 cultivadas com *C. albicans*, secretaram menor quantidade de IL-17A em comparação com o controle. Porém, para tanto, tais células dendríticas haviam secretado significativamente menos IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23 comparadas com as selvagens (SAIJO et al., 2010). Ademais, em PBMCs, um perfil predominantemente Th17/Th22 foi relacionado à forma crônica da doença (DE CASTRO et al., 2013), não sendo possível, dessa forma, ser avaliado pelo presente estudo.

Finalmente, para se confirmar a relevância de Dectina-2 no reconhecimento de *P. brasiliensis* em diferentes modelos, camundongos deficientes do receptor foram infectados para experimentos *in vivo*. Corroborando com os resultados preliminares de sobrevivência, os animais deficientes do receptor apresentaram uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias nos órgãos investigados, enquanto houve um aumento de IL-10 e TGF- $\beta$  em seus pulmões nos tempos determinados (Fig. 24).

Em estudos prévios, nos camundongos suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis*, a presença de TGF- $\beta$ , secretada por macrófagos alveolares e células dendríticas, juntamente com os maiores números de células Tregs relacionadas a ela induziram uma tolerância e uma supressão inicial da resposta imune. Entretanto, o tratamento com anti-CD25 foi capaz de

alterar tal condição, fazendo com que houvesse aumento na expansão e na migração de células T para o sítio de infecção na sua fase inicial (FELONATO et al., 2012). Ainda, a ausência de IL-10 em camundongos infectados pelo fungo foi relacionada a uma diminuição da carga fúngica no fígado e no baço, associada a um aumento das funções efetoras de macrófagos, aumentando, dessa forma, a sobrevivência desses animais (COSTA et al., 2013). Deste modo, constatou-se que uma resposta Treg, com TGF- $\beta$  e IL-10, é prejudicial diante de uma infecção pelo fungo.

Por outro lado, em humanos, a presença TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  induziria certa limitação do crescimento fúngico, levando a uma forma crônica da doença. Contudo, tais citocinas poderiam causar uma resposta imune exacerbada com ativação de neutrófilos, dano tecidual e posterior fibrose. Nessa situação, outros tipos de resposta – Th1, Th2 e Treg – seriam necessárias também para um melhor controle da infecção (CASTRO et al., 2013). Assim, tais resultados sugerem que o tipo de resposta relacionada à presença de TGF- $\beta$  (Th17 ou Treg) é dependente da presença de outras citocinas, como IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$ . No presente estudo, o perfil de resposta que pareceu estar mais presente nos animais deficientes infectados foi Treg, tendo em vista a observação da diminuição de IL-6, aumento de TGF- $\beta$  e IL-10 nos pulmões.

Paralelamente à menor produção de citocinas pró-inflamatórias, foi possível observar ainda ampla diferença na detecção de unidades formadoras de colônias no pulmão de camundongos deficientes comparados com o grupo controle em 30 dias, aumentando ainda mais essa diferença após 60 dias de infecção (Fig. 25). Corroborando com esses dados, a patologia pulmonar dos animais deficientes de Dectina-2 foi mais ampla, havendo mais infiltrado celular em 30 e 60 dias após a infecção, além de ser possível a observação de maiores quantidades de leveduras no tecido (Fig. 26). Dessa forma, a resposta imune desses animais não demonstrou ser eficaz diante de uma infecção pelo fungo. Esses resultados confirmam que a falta do receptor gera uma maior susceptibilidade de camundongos diante da infecção por *P. brasiliensis*, relacionada a uma maior carga fúngica pulmonar em comparação com os selvagens, ainda que a diferença na produção de IFN- $\gamma$  não tenha sido detectada.

Da mesma forma, camundongos tratados com anticorpos anti-Dectina-2 e infectados com *C. albicans* apresentaram maior carga fúngica nos rins em comparação com o grupo não tratado. Tal resultado estava associado à redução de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 no órgão (ZHU et al., 2013). No entanto, resultados divergentes foram constatados na infecção por *Coccidioides immitis*, uma vez que não foi observada diminuição da contagem de UFC nos pulmões e baços de camundongos deficientes de Dectina-2 em comparação com os

selvagens, assim como não houve diminuição da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  em seus fluidos pulmonares (VIRIYAKOSOL et al., 2014).

Ademais, camundongos deficientes do receptor infectados intratraquealmente por *C. neoformans* não apresentaram diferença no número de UFC pulmonar aos 7, 14 ou 28 dias após a infecção, e tampouco mostraram diferença na expressão de RNA mensageiro de IFN- $\gamma$  e IL-17, quando comparados com o grupo controle (NAKAMURA et al., 2015). Posto isso, uma maior redução da carga fúngica tecidual parece estar mais relacionada à produção de citocinas pró-inflamatórias iniciais e uma resposta imune inata mais efetiva nesses modelos de infecção.

Em relação à Dectina-3, em resultados anteriores utilizando-se diferente método experimental, linfócitos TCD4<sup>+</sup> recuperados de pulmões de camundongos deficientes do receptor, previamente vacinados e infectados por *Blastomyces dermatitidis*, produziram menores níveis de IL-17, mas não de IFN- $\gamma$ , comparados com os selvagens (WANG et al., 2016). Diante desses resultados, Dectina-3 seria importante na indução de uma resposta com perfil Th17, gerando proteção contra o fungo citado. O receptor também parece ser relevante na resposta contra *C. albicans*, uma vez que camundongos deficientes infectados pelo fungo apresentaram maior carga fúngica nos rins e menores níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e IL-1 $\beta$  em comparação com os selvagens (ZHU et al., 2013). Contudo, no presente estudo, a deficiência de Dectina-3 parece não influenciar a susceptibilidade de camundongos frente a uma infecção específica por *P. brasiliensis* – uma vez que camundongos deficientes do receptor não apresentaram menor sobrevivência em comparação com aqueles selvagens –, dependendo assim, do modelo experimental estabelecido.

São necessários novos estudos para se estabelecer uma possível relação entre a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, especificamente TNF- $\alpha$  e IL-6, e a sobrevivência dos animais deficientes do receptor. Camundongos deficientes de Dectina-3 parecem possuir uma maior susceptibilidade à infecção em sua fase inicial (antes de 20 semanas), em comparação com os selvagens, podendo esta decorrer de uma maior resposta inflamatória inicial.

O que se verificou no presente estudo foi o importante papel de um CLR – Dectina-2 – no reconhecimento de *P. brasiliensis* em modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção. Entretanto, não se pode descartar a relevância de outros PRRs nos resultados observados. Por isso, permanece sendo necessária a investigação de outros CLRs como, por exemplo, Dectina-3 na resposta imune diante do fungo, uma vez que já foi comprovado que tal receptor forma heterodímeros com Dectina-2 para o reconhecimento da parede celular de *C. albicans* (ZHU et al., 2013) e, de alguma forma, ainda possui um papel importante no reconhecimento de *P. brasiliensis* por células dendríticas plasmocitóides humanas (PREITE et al., 2018).

Assim, CLRs podem formar diferentes homo e heterodímeros para a resposta imune inata e conseqüentemente adaptativa diante de diversos micro-organismos, podendo exercer suas funções em sinergismo e, até mesmo, antagonismo. (KERSCHER et al., 2016; RICHARDSON; WILLIAMS, 2014; MIYAKE; OH-HORA; YAMASAKI, 2015). Nesse sentido, a devida manipulação – bloqueio ou ativação – desses receptores pode ser eventualmente utilizada em pesquisas aplicadas necessárias para o controle da PCM.

## 7 CONCLUSÕES

---

*“Nossa geração é realista porque chegamos a conhecer o ser humano como ele de fato é. Afinal, ele é aquele ser que inventou as câmaras de gás de Auschwitz; mas ele é também aquele ser que entrou naquelas câmaras de gás de cabeça erguida, tendo nos lábios o Pai-Nosso ou o Shemá Yisrael.”*  
(Viktor Frankl)

1. Dectina-2 possui um papel fundamental no reconhecimento de *P. brasiliensis*, de forma que sua ausência:

1.1 Compromete a ativação de uma resposta imune inata efetora,

- ✓ diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) e reguladora (IL-10) por BMDCs infectadas pelo fungo;
- ✓ diminuindo a produção de NO e fagocitose por BMDMs deficientes;
- ✓ aumentando a proliferação de leveduras em BMDMs infectadas;

1.2 Compromete a ativação de uma resposta imune adaptativa protetora *in vitro*,

- ✓ levando a uma maior produção de IL-13 e menor de IFN- $\gamma$  por linfócitos T cultivados com BMDCs deficientes;

1.3 Gera uma maior susceptibilidade murina diante de uma infecção pelo fungo,

- ✓ diminuindo a produção de citocinas consideradas relevantes para o controle da infecção e aumentando aquelas reguladoras;
- ✓ aumentando a carga fúngica pulmonar de camundongos infectados e
- ✓ diminuindo sua sobrevivência.

2. Dectina-1 e Dectina-2; Dectina-3 e Mincl não propiciam uma resposta imune complementar diante da infecção por *P. brasiliensis*.

3. Dectina-3 parece não ser fundamental para o estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra *P. brasiliensis* em modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACORCI-VALÉRIO, M. J.; BORDON-GRACIANI, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; DE ASSIS GOLIM, M.; NAKAIRATAKAHAGI, E.; DE CAMPOS SOARES, A. M. V. Role of TLR2 and TLR4 in Human Neutrophil Functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 71, p. 99–108, 2010.
- ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**. v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998.
- BACHIEGA, T. F.; DIAS-MELICIO, L. A.; FERNANDES, R. K.; DE ALMEIDA BALDERRAMAS, H.; RODRIGUES, D. R.; XIMENES, V. F.; DE CAMPOS SOARES, Â. M. V. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. **Immunobiology**. v. 221, n. 2, p. 228–235, 2016.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 58, p. 505–512, 1998.
- BARRETO-BERGTER, E.; FIGUEIREDO, R. T. Fungal glycans and the innate immune recognition. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 4, n. 145, p. 1-17, 2014.
- BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S. Imbalance of IL-2, IFN-g and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**. v. 13, p. 248–252, 2001.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**. v. 40, p. 845–859, 2004.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**. v. 32, p.305 –15, 2010.
- BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; A. P.; CAMPANELLI, CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. 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, p. 3056-3063, 1998.
- BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SATO, P. K.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FELIPE, M. S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**. v. 8, n. 9, p. 1177–1191, 2013.
- BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; LIMA BLOTTA, M. H. S. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**. v. 47, n. 7, p. 722–733, 2009.

BOTOS, I.; SEGAL, D. M.; DAVIES, D. R. The structural biology of toll-like receptors. **Structure**. v. 19, p. 447–459, 2011.

BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K. Fungal pathogens—a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**. v. 2, n. 142, 2012.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual Reviews in Immunology**. v. 29, p. 1–21, 2011.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**. v. 19, n. 165, 2012.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. 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.

CAIXETA, C. A.; DE CARLI, M. L.; RIBEIRO JÚNIOR, N. V.; SPERANDIO, F. F.; NONOGAKI, S.; NOGUEIRA, D. A.; PEREIRA, A. A. C.; HANEMANN, J. A. C. Estrogen Receptor- $\alpha$  Correlates with Higher Fungal Cell Number in Oral Paracoccidioidomycosis in Women. **Mycopathologia**. v. 183, n. 5, p. 785–791, 2018.

CALICH, V. L. G.; DA COSTA, T. A.; FELONATO, M.; ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; RIBEIRO, L. R. R.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**. v. 165, p. 223–236, 2008.

CALICH, V. L.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T. A.; LOURES, F. V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. v. 53, n. 1, p. 1–7, 2008.

CALICH, V. L.; 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.

CALVI, S. A.; PERAÇOLI, M. T.; MENDES, R. P.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MARQUES, S. A. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infection**. v. 5, p. 107–113, 2003.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. **Mediators of Inflammation**. p. 1–19, 2017.

CAMPOS, E. G.; JESUINO, R. S. A.; DANTAS, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; FELIPE, M. S. S. Oxidative stress response in *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Genetic and Molecular Research**. v. 4, n. 2, p. 409–429, 2005.

CAMPUZANO, A.; CASTRO-LOPEZ, N.; WOZNIAK, K. L.; WAGER, C. M. L.; WORMLEY JR, F. L. Dectin-3 is not required for protection against *Cryptococcus neoformans* infection. **Plos one**. v. 12, n. 1, p. 1-14, 2017.

CAO, Z.; XIONG, J.; TAKEUCHI, M.; KURAMA, T.; GOEDDEL, D. V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. **Nature**. v. 383, p. 443–446, 1996.

CARMO, J. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; CALVI, S. A.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A. M. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H2O2-dependent mechanism. **Medical Mycology**. v. 44, n. 4, p. 363-368, 2006.

CELLA, M.; SALLUSTO, F.; VECCHIA, A. L. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**. v. 9, n. 1, p. 10-16, 1997.

CHANG, T.H.; HUANG, J. H.; LIN, H. C.; CHEN, W. Y.; LEE, Y. H.; HSU, L. C.; NETEA, M. G.; TING, J. P. Y.; WU-HSIEH, B. A. Dectin-2 is a primary receptor for NLRP3 inflammasome activation in dendritic cell response to *Histoplasma capsulatum*. **PLoS Pathogens**. v. 13, n. 7, 2017.

COSTA, T. A.; BAZAN, S. B.; FERIOTTI, C.; ARAÚJO, E. F.; BASSI, Ê.; LOURES, F. V.; CALICH, V. L. In pulmonary paracoccidioidomycosis IL-10 deficiency leads to increased immunity and regressive infection without enhancing tissue pathology. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 10, p. 1-13, 2013.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, p. 1441–1454, 2002.

COUTINHO, Z. F.; WANKE, B.; TRAVASSOS, C.; OLIVEIRA, R. M.; XAVIER, D. R.; COIMBRA, C. E. J. R. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine & International Health**. v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

DA SILVA, R. P.; HEISS, C.; BLACK, I.; AZADI, P.; GERLACH, J. Q.; TRAVASSOS, L. R.; JOSHI, L.; KILCOYNE, M.; PUCCIA, R. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. **Scientific Reports**. v. 5, n. 14213, 2015.

DAMBUZA, I. M.; BROWN, G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. **Current Opinion in Immunology**. v. 32, p. 21–27, 2015.

DE CASTRO, L. F.; FERREIRA, M. C.; DA SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H.; LONGHI, L. N.; MAMONI, R. L. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**. v. 67, n. 5, p. 470–485, 2013.

DE FARIAS, M. R.; CONDAS, L. A.; RIBEIRO, M. G.; BOSCO, S. D. E. M.; MURO, M. D.; et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**. v. 172, n. 15, p. 147–152, 2011.

DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; MARCOS, C. M.; SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C.; DA SILVA, J. D. E. F.; SINGULANI, J. D. E. L.; ALARCON, K. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-20, 2015.

DRUMMOND, R. A.; LIONAKIS, M. S. Mechanistic insights into the role of C Type Lectin Receptor/CARD9 signaling in human antifungal immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 6, n. 39, p. 1-11, 2016.

ENGERING, A.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; VAN VLIET, S. J.; WIJERS, M.; VAN LIEMPT, E.; DEMAUREX, N.; LANZAVECCHIA, A.; FRANSEN, J.; FIGDOR, C. G.; PIGUET, V.; VAN KOOYK, Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *The Journal of Immunology*. v. 168, p. 2118–26, 2002

ESTEBAN, A.; POPPA, M. W.; VYASA, V. K.; STRIJBISA, K.; PLOEGHA, H. L.; FINK, G. R. Fungal recognition is mediated by the association of Dectin-1 and galectin-3 in macrophages. **PNAS**. v. 108, n. 34, p. 14270–14275, 2011.

FELIPE, M. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F. B.; NICOLA, A. M.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M.; ANDRADE, P. A.; TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; KYAW, C. M.; SOUZA, D. P.; NETWORK P.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; ANDRADE, E. V.; PARENTE, J. A.; OLIVEIRA, G. S.; BARBOSA, M. S.; MARTINS, N. F.; FACHIN, A. L.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E.; SOARES, C. M.; CARVALHO, M. J.; BRIGIDO, M. M. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **Jounal of Biology Chemistry**. v. 280, p. 24706-24714, 2005.

FELONATO, M.; PINA, A.; DE ARAUJO, E. F.; LOURES, F. V.; BAZAN, S. B.; FERIOTTI, C.; CALICH, V. L. Anti-CD25 treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One**. v. 7, n. 11, p. 1-20, 2012.

FERIOTTI, C.; BAZAN, S. B.; LOURES, F. V.; ARAÚJO, E. F.; COSTA, T. A.; CALICH, V. L. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. 913, 2015.

FERIOTTI, C.; DE ARAÚJO, E. F.; LOURES, F. V.; DA COSTA, T. A.; GALDINO, N. A. L.; ZAMBONI, D. S.; CALICH, V. L. G. NOD-Like Receptor P3 inflammasome controls protective th1/th17 immunity against pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**. v. 8, n. 786, p. 1-15, 2017.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology Letters**. v. 94, p. 107–114, 2004.

FONSECA, F. L.; NOHARA, L. L.; CORDERO, R. J. B.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Immunomodulatory Effects of Serotype B Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* Correlate with Polysaccharide Diameter. **Infection and Immunity**. v. 78, n. 9, p. 3861–3870, 2010.

GEIJTENBEEK, T.B.; TORENSMA, R.; VAN VLIET, S. J.; VAN DUIJNHOF, G. C.; ADEMA, G. J.; VAN KOOYK, Y.; FIGDOR, C. G. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**. v. 100, p. 575–85, 2000

GEIJTENBEEK, T. B.; GRINGHUIS, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nature Reviews in Immunology**. v. 9, n. 7, p. 465-479, 2009.

GONZALES, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 2546-2552, 2000.

GONZÁLEZ, A.; YÁÑEZ, A.; GOZALBO, D.; GIL, M. L. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 54, n. 3, p. 365-374, 2008.

GOODRIDGE, H. S.; REYES, C. N.; BECKER, C. A.; KATSUMOTO, T. R.; MA, J.; WOLF, A. J. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. **Nature**. v. 472, p. 471–475, 2011.

GRAHAM, L. M.; GUPTA, V.; SCHAFER, G.; REID, D. M.; KIMBERG, M.; DENNEHY, K. M.; HORNSSELL, W. G.; GULER, R.; CAMPANERO-RHODES, M. A.; PALMA, A. S.; FEIZI, T.; KIM, S. K.; SOBIESZCZUK, P.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. The C-type Lectin Receptor CLECSF8 (CLEC4D) is expressed by myeloid cells and triggers cellular activation through Syk kinase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, n. 31, p. 25964–25974, 2012.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GRINGHUIS, S. I.; DEN DUNNEN, J.; LITJENS, M.; VAN HET HOF, B.; VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-kappaB. **Immunity**. v. 26, p. 605–616, 2007.

GROSS, O.; POECK, H.; BSCHIEDER, M.; DOSTERT, C.; HANNESSCHLÄGER, N.; ENDRES, S.; RULAND, J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**. v. 459, n. 7245, p. 433–436, 2009.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**. v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. C-type Lectin Receptors orchestrate anti-fungal immunity. **Nature Immunology**. v. 13, n. 9, p. 817–822, 2012.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a road map for control and elimination. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 2, n. 9, 2008.

HOVING, J. C.; WILSON, G. J.; BROWN, G. D. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. **Cell Microbiology**. v. 16, n. 2, p. 185-194, 2014.

HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. **Current Opinion in Microbiology**. v. 12, n. 4, p. 347-349, 2009.

IFRIM, D. C.; BAIN, J. M.; REID, D. M.; OOSTING, M.; VERSCHUEREN, I.; GOW, N. A. R.; VAN KRIEKEN, J. H.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN DER MEER, J. W. M.; KOENTGEN, F.; ERWIG, L. P.; QUINTIN, J.; NETEA, M. G. Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. **Infection and Immunity**. v. 82, n. 3, p. 1064 –1073, 2014.

IFRIM, D. C.; QUINTIN, J.; COURJOL, F.; VERSCHUEREN, I.; KRIEKEN, J. H. V.; KOENTGEN, F.; FRADIN, C.; GOW, N. A. R.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN DER MEER, J. W. M.; VAN DE VEERDONK, F.; NETEA, M. G. The role of dectin-2 for host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 36, n. 4, p. 267–276, 2016.

ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, T.; MORITA, Y. S.; TOYONAGA, K.; YAMADA, H.; TAKEUCHI, O.; KINOSHITA, T.; AKIRA, S.; YOSHIKAI, Y.; YAMASAKI, S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. **Journal of Experimental Medicine**. v. 206, p. 2879–2888, 2009.

JANNUZZI, G. P.; DE ALMEIDA, J. R. F.; AMARANTE-MENDES, G. P.; ROMERA, L. M. D.; KAIHAMI, G. H.; VASCONCELOS, J. R.; FERREIRA, C. P.; DE ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. TLR3 is a negative regulator of immune responses against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers of Cell Infection Microbiology**. v. 8, 2019.

KARHAWI, A. S.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Medical Mycology**. v. 38, n. 3, p. 225-229, 2000.

KASHINO, S. S.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. **Mycopathologia** v. 111, n. 3, p. 173–180, 1990.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**. v. 5, n. 461, 2014.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. **Nature Immunology**. v. 1, n. 5, p. 373-384, 2010.

KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**. v. 214, p. 562–575, 2009.

KERSCHER, B.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update. **International Immunology**. v. 22, n. 1, p. 271–277, 2013.

KERSCHER, B.; WILSON, G. J.; REID, D. M.; MORI, D.; TAYLOR, J. A.; BESRA, R. S.; YAMASAKI, S.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. Mycobacterial receptor, Clec4d (CLECSF8, MCL), is coregulated with Mincle and upregulated on mouse myeloid cells following microbial challenge. **European Journal of Immunology**. v. 46, p. 381–389, 2016.

KETELUT-CARNEIRO, N.; GHOSH, S.; LEVITZ, S. M.; FITZGERALD, K. A.; DA SILVA, J. S. A Dectin-1-Caspase-8 Pathway Licenses Canonical Caspase-1 Inflammasome Activation and Interleukin-1 $\beta$  Release in Response to a Pathogenic Fungus. **The Journal of Infection Disease**. v. 217, n. 2, p. 329-339, 2018.

KETELUT-CARNEIRO, N.; SILVA, G. K.; ROCHA, F. A.; MILANEZI, C. M.; CAVALCANTI-NETO, F. F.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S. 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.

KOTTOM, T. J.; HEBRINK, D. M.; JENSON, P. E.; MARSOLEK, P. L.; WÜTHRICH, M.; WANG, H.; KLEIN, B.; YAMASAKI, S.; LIMPER, A. H. Dectin-2 is a C-Type Lectin Receptor that recognizes *Pneumocystis* and participates in innate immune responses. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 58, n. 2, p. 232-240, 2018.

LEONHARDT, LUIZA CHAVES DE MIRANDA. Modulação da atividade dos macrófagos por diferentes formas do *Fonsecaea pedrosoi*. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília.

LOURES, F. V.; STROEDER, H.; ALMEIDA, I.; CALICH, V. L. G. *Paracoccidioides brasiliensis* lipids modulate macrophage activity via Toll-dependent or independent mechanisms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 66, p. 58–70, 2012.

LOURES, F. V.; ARAÚJO, E. F.; FERIOTTI, C.; BAZAN, S. B.; COSTA, T. A.; BROWN, G. D.; CALICH, V. L. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of

CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection Disease**. v. 210, n. 5, p 762-773, 2014.

LOURES, F. V.; ARAÚJO, E. F.; FERIOTTI, C.; BAZAN, S. B.; CALICH, V. L. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Frontiers in Microbiology**. v. 31, n. 6, 2015.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; RÖSSNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. 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.

MARQUES MELLO, L.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES, V. J. R. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. **Human Immunology**. v. 63, n. 2, p. 149-154, 2002.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica, diagnóstica e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.

MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. Primary complex of paracoccidioidomycosis and hyper eosinophilia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 35, p. 1259-1262, 2009.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease Paracoccidioidomicose: a dimensão do problema de uma doença negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 4, p. 480, 2010.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Reviews in Immunology**. v. 27, p. 229–265, 2009.

MCEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 25, n. 3, p. 165-175, 1987.

MCGREAL, E. P.; ROSAS, M.; BROWN, G. D.; ZAMZE, S.; WONG, S. Y.; GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L.; TAYLOR, P. R. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. **Glycobiology**. v. 16, p. 422–430, 2006.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**. v. 9, p. 4–9, 1997.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001.

MENINO, J. F.; SARAIVA, M.; GOMES-ALVES, A. G.; LOBO-SILVA, D.; STURME, M.; GOMES-REZENDE, J.; SARAIVA, A. L.; GOLDMA, G. H.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; ROMANI, L.; PEDROSA, J.; CASTRO, A. G.; RODRIGUES, F. TLR9 Activation Dampens the Early Inflammatory Response to *Paracoccidioides brasiliensis*, Impacting Host Survival. **PLOS Neglected Tropical Disease**. v. 7, n. 7, 2013.

MIYAKE, Y.; MASATSUGU, O. H.; YAMASAKI, S. C-Type Lectin Receptor MCL facilitates Mincle expression and signaling through complex formation. **The Journal of Immunology**. v. 194, n. 11, p. 5366-5374, 2015.

MIYAKE, Y.; TOYONAGA, K.; MORI, D.; KAKUTA, S.; HOSHINO, Y.; OYAMADA, A.; YAMADA, H.; ONO, K.; SUYAMA, M.; IWAKURA, Y.; YOSHIKAI, Y.; YAMASAKI, S. C-type Lectin MCL is an FcRg-coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor. **Immunity**. v. 38, n. 5, p. 1050–1062, 2013.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMERT, E.; STEVENST, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**. v. 40, p. 159-164, 1994.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**. v. 136, n. 7, 1986.

NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; GOLIM, M. A.; BANNWART, C. F.; PUCCIA, R.; PERAÇOLI, M. T. TLR4 Interactions between TLR2 and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. **Medical Mycology**. v. 49, n. 7, p. 694-703, 2011.

NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; GOLIM, M. A.; BANNWART, C. F.; PUCCIA, R.; PERAÇOLI, M. T. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. **Medical Mycology**. v. 49, n. 7, p. 694-703, 2011.

NAKAMURA, Y.; SATO, K.; YAMAMOTO, H.; MATSUMURA, K.; MATSUMOTO, I.; NOMURA, T.; MIYASAKA, T.; ISHII, K.; KANNO, E.; TACHI, M.; YAMASAKI, S.; SAIJO, S.; IWAKURA, Y.; KAWAKAMIA, K. Dectin-2 deficiency promotes th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**. v. 83, n. 2, p. 671-681, 2015.

NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L. G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. **The Journal of Immunology**. v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NETEA, M. G.; WARRIS, A.; VAN DER MEER, J. W.; FENTON, M. J.; VERVER-JANSSEN, T. J.; JACOBS, L. E.; ANDRESEN, T.; VERWEIJ, P. E.; KULLBERG, B. J. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like

receptor-4-mediated signal transduction. **The Journal of Infected Disease**. v. 188, n. 2, p. 320-326, 2003.

NETEA, M. G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 23, n. 9, p. 672-676, 2004.

NETEA, M. G.; GOW, N. A.; MUNRO, C. A.; BATES, S.; COLLINS, C.; FERWERDA, G.; HOBSON, R. P.; BERTRAM, G.; HUGHES, H. B.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; BUURMAN, E. T.; GIJZEN, K.; WILLIAMS, D. L.; TORENSMA, R.; MCKINNON, A.; MACCALLUM, D. M.; ODDS, F. C.; VAN DER MEER, J. W.; BROWN, A. J.; KULLBERG, B. J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **Journal of Clinical Investigation**. v. 116, n. 6, p.1642-1650, 2006.

PAGLIARI, C.; FERNANDES, E. R.; STEGUN, F. W.; DA SILVA, W. L.; DUARTE, M. I.; SOTTO, M. N. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microbial Pathogenesis**. v. 50, n. 5, p. 263-267, 2011.

PALMA, A. S.; FEIZI, T.; ZHANG, Y.; STOLL, M. S.; LAWSON, A. M.; DIAZ-RODRIGUEZ, E.; CAMPANERO-RHODES, M. A.; COSTA, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D.; CHAI, W. Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, p. 5771–5779, 2006.

PLATO, A.; HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. **Seminars in Immunopathology**. v. 3, p. 97–106, 2015.

PLATO, A.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-Type Lectin-Like Receptors of the Dectin-1 Cluster: ligands and signaling pathways. **International Reviews of Immunology**. v. 32, p. 134–156, 2013.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**. v. 218, n. 2, p. 87-94, 2002.

PREITE, N. W.; FERIOTTI, C.; DE LIMA, D. S.; DA SILVA, B. B.; CONDINO-NETO, A.; PONTILLO, A.; CALICH, V. L. G.; LOURES, F. V. The syk-coupled c-Type lectin receptors Dectin-2 and Dectin-3 are involved in *Paracoccidioides brasiliensis* recognition by human Plasmacytoid Dendritic cells. **Frontiers in Immunology**. v. 9, n. 464, 2018.

RESTREPO, B. I.; MCEWEN, J. G.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. Morphological development of the conidia produced. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 24, n. 4, p. 337-339, 1986.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**. v. 39, p. 233–241, 2001.

RICHARDSON, M. B.; WILLIAMS, S. J. MCL and Mincle: C-type lectin receptors that sense damaged self and pathogen-associated molecular patterns. **Frontier in Immunology**. v. 5, n. 288, p. 1-9, 2014.

ROMAGNOLO, A. G.; DE QUAGLIA E SILVA, J. C.; DELLA, COLETTA, A. M.; GARDIZANI, T. P.; MARTINS, A. T. L.; ROMAGNOLI, G. G.; KANENO, R.; DE CAMPOS SOARES, A. M. V.; DE FAVERI, J.; DIAS-MELICIO, L. A.; Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**. v. 61, n. 4, p. 222-230, 2018.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **TRENDS in Microbiology**. v.14, n .4, 2006.

SAIJO, S.; IKEDA, S.; YAMABE, K.; KAKUTA, S.; ISHIGAME, H.; AKITSU, A.; FUJIKADO, N.; KUSAKA, T.; KUBO, S.; CHUNG, S. H.; KOMATSU, R.; MIURA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; SHIBUYA, K.; YAMAMOTO, N.; KAWAKAMI, K.; YAMASAKI, S.; SAITO, T.; AKIRA, S.; IWAKURA, Y. Dectin-2 Recognition of a-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity**. v. 32, p. 681–691, 2010.

SAIJO, S., IWAKURA, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. **International Immunology**. v. 23, n. 8, p. 467–472, 2011.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**. v. 101, p. 455–458, 2000.

SANCHO, D.; SOUSA, C. R. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. **Annual Review of Immunology**. v. 30, p. 491–529, 2012.

SCHOENEN, H.; BODENDORFER, B.; HITCHENS, K.; MANZANERO, S.; WERNINGHAUS, K.; NIMMERJAHN, F.; AGGER, E. M.; STENGER, S.; ANDERSEN, P.; RULAND, J.; BROWN, G. D.; WELLS, C.; LANG, R. Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of the Mycobacterial Cord Factor and its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate. **The Journal of Immunology**. v. 184, p. 2756–2760, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em Paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F. D.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SILVA, DAWANNE APARECIDA. Uso de agonistas de Receptores de Reconhecimento de Padrões na modulação da atividade de macrófagos murinos infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*. 2018. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. 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.

STEICHEN, A. L.; BINSTOCK, B. J.; MISHRA, B. B.; SHARMA, J. C-type lectin receptor Clec4d plays a protective role in resolution of Gram-negative pneumonia. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 94, n. 3, p. 393–398, 2013.

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**. v. 13, p. 139–145, 2007.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**. v. 28, p. 521–574, 2007.

STROWIG, T.; HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; FLAVELL, R. Inflammasomes in health and disease. **Nature**. v. 481, n. 7381, p. 278–286, 2012.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; LOPEZ, A.; URÁN, M.; HERRERA, J.; BORGES, C. L.; RESTREPO, A.; SOARES, C. M.; TABORDA, C. P.; ALMEIDA, A. J.; MCEWEN, J. G.; HERNÁNDEZ, O. Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 3, 2016.

TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; DANTAS, A.; CAMPOS, E. G.; ANDRADE, R. V.; MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M.; PASSOS-SILVA, D. G.; FACHIN, A. L.; TEIXEIRA, S. M.; PASSOS, G. A.; SOARES, C. M.; BOCCA, A. L.; CARVALHO, M. J.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M. S. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes and Infection**. v. 9, n. 5, p. 583-90, 2007.

TAVARES, A. H.; MAGALHÃES, K. G.; ALMEIDA, R. N.; CORREA, R.; BURGEL, P. H.; BOCCA, A. L. NLRP3 Inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 12, p. 1-11, 2013.

TAVARES, A. H.; BÜRGEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. **PLoS Pathogens**. v. 11, n. 7, 2015.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE M. S. S. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**. v. 10, n. 10, 2014.

- TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; SOARES FELIPE, M. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**. v. 52, n. 2, p. 19–28, 2013.
- TREJO-CHAVEZ, A.; RAMIREZ-ROMERO, R.; ANCER-RODRIGUEZ, J.; NEVAREZ-GARZA, A. M.; RODRIGUEZ-TOVAR, L. E. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). **Journal of Comparative Pathology**. v. 144, p. 231–234, 2011.
- TRISTÃO, F. S. M.; ROCHA, F. A.; CARLOS, D.; KETELUT-CARNEIRO, N.; SOUZA, C. A. O. S.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S. Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma formation during experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**. v. 8, n. 949, p. 1-13, 2017.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; GOW, N. A.; NETEA, M. G. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**. v. 11, n. 4, p. 305-312, 2008.
- VIRIYAKOSOL, S.; JIMENEZ, M. P.; SAIJO, S.; FIERERA, J. Neither Dectin-2 nor the Mannose Receptor is required for resistance to *Coccidioides immitis* in mice. **Infection and Immunity**. v. 82, n. 3, p. 1147–1156, 2014.
- WANG, H.; LI, M.; LERKSUTHIRAT, T.; KLEIN, B.; WÜTHRICH, M. The C-type lectin receptor MCL mediates vaccine-induced immunity against infection with *Blastomyces dermatitidis*. **Infection and Immunity**. v. 84, p. 635–642, 2016.
- WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: **CRC Press**; 1994. p. 109-20.
- WANG, C.; DENG, L.; HONG, M.; AKKARAJU, G. R.; INOUE, J.; CHEN, Z. J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**. v. 412, p. 346–351, 2001.
- WILSON, G. J.; MARAKALALA, M. J.; HOVING, J. C.; VAN LAARHOVEN, A.; DRUMMOND, R. A.; KERSCHER, B.; KEETON, R.; VAN DE VOSSE, E.; OTTENHOFF, T. H.; PLANTINGA, T. S.; ALISJAHBANA, B.; GOVENDER, D.; BESRA, G. S.; NETEA, M. G.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; JACOBS, M.; YAMASAKI, S.; VAN CREVEL, R.; BROWN, G. D. The C-Type Lectin Receptor CLECSF8/CLEC4D is a key component of anti-mycobacterial immunity. **Cell Host & Microbe**. v. 17, n. 2, p. 252–259, 2015.
- YABE, R.; SAIJO, S. C-Type Lectin Receptors in Immunity, Dectin-2 in Antimicrobial Immunity and Homeostasis. S. Yamasaki ed. Japan: Springer, 2016.
- YAMASAKI, S.; ISHIKAWA, E.; SAKUMA, M.; HARA, H.; OGATA, K.; SAITO, T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. **Nature Immunology**. v. 9, p.179–188, 2008.

ZELENSKY, A.N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS Journal**.v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.

ZHANG, J.; ZHU, J.; BU, X.; CUSHION, M.; KINANE, T. B.; AVRAHAM, H.; KOZIEL, H. Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages. **Molecular Biology Cell**. v. 16, p. 824–834, 2005.

ZHU, L. L.; ZHAO, X. Q.; JIANG, C.; YOU, Y.; CHEN, X. P.; JIANG, Y. Y.; JIA, X. M.; LIN, X. 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.