UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

***Ativação do inflamassoma de NLRC4 confere suscetibilidade à infecção
por Paracoccidioides brasiliensis***

Camila de Oliveira Silva e Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Camila de Oliveira Silva

Ativação do inflamassoma de NLRC4 confere suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. Ribeirão Preto, 2017

104p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Silva, João Santana

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Inflamassoma. 3. NLRC4.

Nome: Camila de Oliveira Silva e Souza

Título: Ativação do inflamassoma de NLRC4 confere suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Santana da Silva. Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento:_____Assinatura_____

Profa. Dr. Lúcia H. Faccioli. Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Julgamento:_____Assinatura_____

Prof.Dr. Sérgio Akira Uyemura. Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Julgamento:_____Assinatura_____

Profa. Dr. Fabiana Simão Machado. Instituição: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento:_____Assinatura_____

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

Marie Curie

*Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus avós, **Arlete** e **Josué**,
e à minha querida mãe **Glaucia**, que por muitas vezes deixaram seus sonhos de
lado para acreditar, incentivar e apoiar os meus. Dedico todos os meus esforços a
vocês.*

Agradecimentos

Ao Prof.Dr. João Santana da Silva, por abrir as portas do seu laboratório, pela orientação, confiança, incentivo, dedicação e amor incondicional pela ciência. Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte deste grupo e me ensinar que a curiosidade é a característica fundamental de um pesquisador e sempre deve ser alimentada.

À Natália Ketelut, por ter me ensinado praticamente todas as técnicas que utilizei ao longo do mestrado. Mesmo que, a distância, sempre se fez presente nas discussões científicas.

Ao “grupo Pb”, que custou em deixar de ser uma dupla e passou a ser um trio com o regresso da “flower” Dra. Fabrine Massafra.

Aos colegas e amigos do laboratório de Imunoparasitologia, Profa.Dra. Vanessa Carregaro, Dra. Luciana Benevides, Dra. Daniela Carlos, Dra. Carla Duque, Gabriela Pessenda, Franciele Pioto, Frederico Ribeiro, Jefferson Leite, Dra. Grace Kelly, Alynne Karen, Herculano da Silva, Bruna Araújo, Laís Sacramento, Dra. Maria Cláudia Silva e aos que passaram por lá, Mikhael Haruo, Pedro Sampaio, Ítala Silva, Gretel Rodriguez, Malena Martinez, Larissa Marfori, Henrique Oliveira, Murilo Solano, por me privilegiarem com a sua convivência amigável, discussões, opiniões e pela ajuda sempre necessária. Muito obrigada a todos.

À Cristiane Milanezi, pelo prestativo apoio técnico.

Aos funcionários, Wander Ribeiro, Olinda Mara, Vera Lúcia Epifanio pela autoclavagem dos materiais, organização e limpeza do laboratório, além do agradável convívio.

À Denise Ferrari pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo.

À Ana Cristine, pelo apoio e amizade, sendo sempre muito solícita em ajudar.

Aos colegas do corredor, Rômulo de Oliveira, Luna Lacerda, Dr. Gustavo Garcia, Dr. Thiago Malardo, Dorlei, Wendy, Isa e Aninha.

Aos integrantes do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Dario Zamboni, pelo aprendizado e constante disponibilidade em ajudar.

Às estagiárias que fazem parte do laboratório de Imunoparasitologia ou que passaram por lá, Letícia Alves, Gabriela Souza e Fernanda Jordão pela ajuda administrativa.

Aos técnicos do biotério Júlio Anselmo, Rubilan Quionero, Edinéilson, Adriana, Dener pela paciência e ajuda com os animais.

Aos pós-graduandos e aos professores da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela contribuição científica.

À Dra. Fabrine Massafra, Natália Ketelut, Dr. Luiz Gustavo Gardinassi, Mikhael Haruo e Prof. Dr. João Santana pelas essenciais correções desta dissertação.

*Ao meu colaborador **Lucas Tavares** pela essencial ajuda com os western blots.*

*Em especial à **Dona Lena**, mesmo que aposentada, gentilmente se disponibilizou a me ensinar os processamentos histológicos e colorações, e de maneira indireta me mostrou que o conhecimento só é válido se passamos adiante.*

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Agradecimentos especiais

À minha família, incluindo meu avô Josué, avó Arlete, mãe Glaucia, tio Marcio, tia Cristiane, primas Maria Eduarda e Maria Fernanda, que me ensinaram meus valores, amores e prioridade, e que de forma indireta, fizeram grande contribuição para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Luiz Gustavo Gardinassi pelo amor, carinho, compreensão, paciência, apoio e respeito às minhas escolhas.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado e que mesmo longe me fazem companhia, além de proporcionar momentos de descontração e alegria.

As agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Center for Research in Inflammatory Diseases (CRIID) pelo apoio financeiro fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado (FAPESP 2015-21605-3), indispensável para minha formação profissional e realização deste trabalho.

Agradecimento à FAPESP

*O desenvolvimento da sociedade sem educação é a criação de riquezas apenas para alguns privilegiados. Devemos incentivar as novas gerações para que elas busquem o conhecimento, e contribuam com novas medidas para o avanço científico e tecnológico. O investimento em apoios financeiros permite o progresso da educação. Assim sendo, gostaria de agradecer grandemente à **Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro dado ao **projeto 2015-21605-3**.*

Apoio suporte e financiamento

Esse projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sobre a coordenação do Prof.Dr. João Santana da Silva, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/ FAPESP (Processo 2012-14524-9).

Sumário

Lista de figuras	14
Resumo	19
Abstract	21
1. Introdução	23
1.1 Paracoccidioidomicose	24
1.2 Resposta imune na paracoccidioidomicose	26
1.3 Resposta granulomatosa durante a PCM	28
1.4 Síntese e liberação da IL-1 β	29
1.5 Receptores do tipo <i>Nod</i>	30
1.5.1 Inflamassoma	31
1.5.1.2 Inflamassoma de NLRP3	32
1.5.1.3 Inflamassoma de NLRC4	34
2. Objetivo	37
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. Material e Métodos	39
3.1 Cultura de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	40
3.2 Meio BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>)-ágar	40
3.3 Preparo de leveduras para inóculo	40
3.4 Viabilidade das leveduras	40
3.5 Animais experimentais e infecção com Pb18	41
3.6 Recuperação de fungos e contagem de unidades formadoras de colônias (CFU)	41
3.7 Análise histopatológica	42
3.8 Imunohistoquímica (IHQ)	42
3.9 Extração de RNA total	43

3.10 Síntese de cDNA	44
3.11 Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)	44
3.12 Obtenção do homogenato pulmonar	45
3.13 Dosagens de citocinas por ELISA	45
3.14 Dosagem de IL-18 por ELISA	46
3.15 Obtenção de leucócitos do pulmão	47
3.16 Citometria de fluxo	47
3.17 Diferenciação de macrófagos a partir de medula óssea	48
3.18 Marcação de caspase-1 ativa	49
3.19 <i>Western blotting</i>	49
3.20 Avaliação da atividade fungicida	50
3.21 Produção de NO	50
3.22 Análise estatística	51
4. Resultados	52
4.1 Os inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 são expressos durante a infecção <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> .	53
4.2 A ativação do inflamassoma de NLRC4 modula a produção de IL-1 β durante a infecção <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> .	55
4.3 Os inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 atuam de maneira distinta durante a infecção <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> .	57
4.4 O inflamassoma de NLRC4 modula a capacidade fungicida de macrófagos infectados <i>in vitro</i> por <i>P. brasiliensis</i> .	59
4.5 O inflamassoma de NLRC4 é responsável pela suscetibilidade do hospedeiro durante a infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i> .	61
4.6 A ausência do inflamassoma de NLRC4 resulta na diminuição do processo fibrótico e na formação de granulomas bem definidos durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i> .	63
4.7 O inflamassoma de NLRC4 regula a expressão de iNOS durante a infecção <i>in vivo</i> por <i>P. brasiliensis</i> .	67
4.8 Os inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 são inversamente expressos durante a infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i> .	68

4.9 O inflamassoma de NLRC4 regula a produção de IL-1 β e IL-18 ao longo da infecção por <i>P. brasiliensis</i> . _____	69
4.10 O inflamassoma de NLRC4 não influencia no perfil Th17 de resposta durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i> . _____	71
4.11 Os níveis de CXCL-1 e CXCL-2 não são alterados na ausência do inflamassoma de NLRC4 durante a infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i> . _____	71
4.12 A ausência do inflamassoma de NLRC4 modula a produção de citocinas do perfil Th1 durante a infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i> . _____	73
4.13 Camundongos deficientes para NLRC4 apresentam um aumento nas células T CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ durante a infecção experimental por <i>P. brasiliensis</i> . _____	74
5. Discussão _____	77
6. Conclusão _____	86
7. Referências _____	88
8. Anexos _____	102
8.1 Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal _____	103
8.2 Anexo 2: Tabela de sequência de iniciadores (primers) murinos utilizados na reação de qPCR. _____	104

Lista de figuras

Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura proteica dos receptores do tipo NOD (NLR)	31
Figura 2. Ativação do inflamassoma de NLRP3	34
Figura 3. Ativação do inflamassoma de NLRC4	36
Figura 4. A infecção por <i>P. brasiliensis</i> modula a expressão dos inflamassomas de NLRC4 e NLRP3	54
Figura 5. A produção <i>in vitro</i> de IL-1 β é regulada pelo inflamassoma de NLRC4 em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	56
Figura 6. A ativação inicial do inflamassoma de NLRC4 regula o inflamassoma de NLRP3 durante o estímulo com <i>P. brasiliensis</i>	58
Figura 7. A atividade fungicida de macrófagos infectados por <i>P. brasiliensis</i> é modulada pela ativação do inflamassoma de NLRC4	60
Figura 8. O inflamassoma de NLRC4 contribui para a suscetibilidade do hospedeiro contra o fungo <i>P. brasiliensis</i>	62
Figura 9. A deficiência do inflamassoma de NLRC4 acarreta em diminuição do processo fibrótico	65
Figura 10. A ausência do inflamassoma de NLRC4 não impede a formação de granulomas durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	66
Figura 11. A ativação da <i>iNOS</i> no tecido pulmonar não é alterada pela ativação do inflamassoma de NLRC4 em camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	67

Figura 12. A expressão do inflamassoma de NLRP3 está aumentada em camundongos *Nlrc4*^{-/-} após a infecção *in vivo* por *P. brasiliensis*_____68

Figura 13. A produção de IL-1 β e IL-18 são reguladas pelo inflamassoma de NLRC4_____70

Figura 14. A defesa antifúngica, que ocorre na ausência do inflamassoma de NLRC4, não depende do perfil de resposta Th17_____72

Figura 15. O inflamassoma de NLRC4 não altera a produção de quimiocinas que auxiliam no recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *P. brasiliensis*_____73

Figura 16. A ativação do inflamassoma de NLRC4 pelo fungo *P. brasiliensis* prejudica a síntese de citocinas envolvidas com a resposta do tipo Th1_____74

Figura 17. A resistência de animais *Nlrc4*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* requer a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺_____76

Lista de abreviaturas

APAF-1	(<i>apoptotic protease – activating factor-1</i>)
APC	Células apresentadoras de antígeno
APCTM	Allophycocyanin
Asc^{-/-}	Deleção homozigótica do gene para a molécula ASC
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATP	Trifosfato de adenosina
B2M	Gene que codifica beta 2- microglobulina
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BMDMs	Macrófagos derivados de células da medula óssea
BSA	Albumina sérica bovina
CCL22	Ligante de quimiocina (motivo CC) 22
CCL27	Ligante de quimiocina (motivo CC) 27
CCR7	Receptor do tipo 7 da quimiocina C-C
CD103	<i>Cluster</i> de diferenciação molecular 103
CD25	<i>Cluster</i> de diferenciação molecular 5
CD3	<i>Cluster</i> de diferenciação molecular 3
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação molecular 4
CD8	<i>Cluster</i> de diferenciação molecular 8
CXCL1	Quimiocina (motivo C X C) ligante 1
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCs	Células dendríticas
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCAS	Síndrome autoinflamatória familiar associada ao frio
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Gapdh	Gene que codifica gliceraldeído 3 fosfato
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócito e macrófago
H₂O₂	Peroxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IFN-γ	Interferon <i>gama</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E

IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p40	Subunidade 40 da interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
<i>IL-18</i>	Gene que codifica para interleucina 18
IL-18	Interleucina 18
IL-1R	Receptor de interleucina 1
<i>IL-1β</i>	Gene que codifica para interleucina 1 <i>beta</i>
IL-1β	Interleucina 1 <i>beta</i>
IL-22	Interleucina 22
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRs	Porção N- terminal rica em repetições de leucina
MAbs	Macrófagos alveolares
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe 2
<i>Myd88</i>	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAIP	Proteína inibidora de apoptose neuronal
NF- κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NLR	Receptor do tipo NOD
<i>Nlrc4</i>	Gene que codifica o inflamassoma de NLRC4
<i>Nlrc4^{-/-}</i>	Deleção homozigótica do gene para o receptor NLRC4
<i>Nlrp3</i>	Gene que codifica o inflamassoma de NLRP3
<i>Nlrp3^{-/-}</i>	Deleção homozigótica do gene para o receptor NLRP3
NO	Oxido nítrico
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NOS2	Oxido nítrico sintetase -2

Pacific Blue™	Bright blue- florescente
Pb18	<i>P.brasiliensis</i> cepa 18
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação de cadeia em polimerase
PE	Phycoerythrin
PECy7	Phycoerythrin-cyanin 7
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
TGF-β	Fator de crescimento e transformação <i>beta</i>
Th1	Resposta de célula T auxiliar tipo 1
Th17	Resposta de célula T auxiliar tipo 17
Th2	Resposta de célula T auxiliar tipo 2
TLR 2	Receptor tipo Toll 2
TLR 4	Receptor tipo Toll 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral <i>alpha</i>
Treg	Células T reguladoras
UFC	Unidade formadora de colônia
WT	<i>Wild type</i> /selvagens

Resumo

SOUZA, COS. **Ativação do inflamassoma de NLRC4 confere suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017,104.

O reconhecimento eficiente do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* pelos receptores do sistema imune inato do hospedeiro é essencial para a proteção contra a paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica prevalente na América Latina. Diferente dos receptores do tipo *Toll* (TLRs), os receptores do tipo *Nod-like* (NLRs) são proteínas citoplasmáticas com capacidade de formar uma plataforma molecular denominada inflamassoma. Esta plataforma ativa caspase-1 e desencadeia a produção de IL-1 β e IL-18. O inflamassoma de NLRC4 regula a resposta imune contra bactérias intracelulares através do reconhecimento de flagelina. No entanto, mesmo na ausência desta molécula, a bactéria *Shigella flexneri* é capaz de ativar o inflamassoma de NLRC4, o que sugere a existência de outros agonistas. Trabalhos recentes mostraram que o inflamassoma de NLRC4 tem papel importante no controle da infecção por *Candida albicans*. Contudo, sua participação na infecção por *P. brasiliensis* é uma incógnita. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a participação do inflamassoma de NLRC4 na paracoccidioidomicose experimental. Os resultados obtidos demonstram que durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*, macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) provenientes de animais *Nlrc4*^{-/-} produzem mais IL-1 β do que BMDM de animais controles. Não foram detectadas diferenças significativas quanto aos níveis de TNF- α em ambos os grupos. Para investigar o mecanismo responsável pelo aumento da produção de IL-1 β por BMDM de camundongos *Nlrc4*^{-/-}, as expressões do gene *Nlrp3* e *Nlrc4* foram avaliadas por qPCR durante, 0, 2, 6, 12, e 24 horas após a infecção. Comparado aos camundongos WT, BMDM de animais *Nlrc4*^{-/-} exibiram um aumento na expressão de *Nlrp3* durante as primeiras 12 horas de infecção. Surpreendentemente, 24 horas após a infecção, um aumento na expressão do gene de *Nlrc4* foi detectado em BMDM de animais *Nlrp3*^{-/-}, comparado ao controle. Estes resultados sugerem que o inflamassoma de NLRC4 reprime a atividade do inflamassoma de NLRP3, e conseqüentemente, anula a produção de IL-1 β em macrófagos estimulados por *P. brasiliensis*. Além disso, camundongos *Nlrc4*^{-/-} exibiram um aumento na produção de IL-1 β e redução na produção de IL-18 aos 7 dias após a infecção *in vivo*. Em contraste, a produção de IL-1 β foi menor e a produção de IL-18 aumentou aos 30 dias após a infecção. Comparado ao grupo controle observamos menor carga fúngica, formação de granulomas bem definidos e compactos e redução na fibrose em pulmões de camundongos *Nlrc4*^{-/-} aos 30 dias após infecção. Adicionalmente, observamos aumento na produção de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-12p40) e níveis reduzidos de IL-10. Em conclusão, estes dados mostram que o inflamassoma NLRC4 tem papel importante na suscetibilidade do hospedeiro durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras chaves: Inflamassoma; NLRC4; *P. brasiliensis*.

Abstract

SOUZA, COS. **NLRC4 inflammasome activation confers susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** Masters dissertation. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2017,104.

The efficient recognition of *P. brasiliensis* fungal cells by immune system receptors is essential for protection against paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis prevalent in Latin America. Different from the Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs) are cytoplasmic proteins able to form the molecular platform, denominated inflammasome. This platform activates caspase-1 and triggers the production of IL-1 β and IL-18. The NLRC4 inflammasome regulates the immune response against intracellular bacteria through recognition of flagellin. However, even in the absence of this structure, the bacteria *Shigella flexneri* activates the NLRC4 inflammasome, suggesting the existence of other agonists. It is known that NLRC4 control the *Candida albicans* infection. Therefore, in this study we evaluated the participation of NLRC4 inflammasome in experimental paracoccidioidomycosis. Our data demonstrated that *Nlrc4*^{-/-} BMDMs produces more IL-1 β than WT BMDMs during *P. brasiliensis* infection. No differences were detected regarding to TNF- α levels in both groups. To investigate the mechanism responsible to improvement of IL-1 β production by *Nlrc4*^{-/-} BMDMs, the *nlrp3* and *nlrc4* gene expression were evaluated by qPCR during 2, 6, 12 and 24 hours post infection. Compared to WT mice, the expression of *nlrp3* was increased in *Nlrc4*^{-/-} BMDMs during the first 12 hours of infection. Surprisingly, at 24 hour post infection and *nlrc4* exhibited increased expression in *Nlrp3*^{-/-} BMDMs, compared to WT controls. These data suggest that NLRC4 represses NLRP3 inflammasome activity, and consequently, abrogates the IL-1 β production by *P. brasiliensis* stimulated macrophages. Furthermore, *Nlrc4*^{-/-} mice exhibited an increased production of IL-1 β and decreased production IL-18 at 7 days post infection *in vivo*. In contrast, there was a decrease in the production of IL-1 β and increased production of IL-18 at 30 days post infection. Compared to controls, we observed lower fungal load, the formation of well-defined and compact lung granulomas, and decreased fibrosis in the lungs of *Nlrc4*^{-/-} mice after 30 days post infection. In addition, we observed increased production of Th1 cytokine profile (IFN- γ , IL-12p40) and reduced levels of IL-10. In conclusion, these data show that NLRC4 inflammasome play an important role on the host susceptibility during *P. brasiliensis* infection.

Keywords: Inflammasome; NLRC4; *P. brasiliensis*.

1. Introdução

1.1 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, de evolução crônica e granulomatosa causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Este fungo é composto pelas variáveis filogenéticas S1, PS2, PS3 e PS4, e pelo *P. lutzii*, uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*, responsável pela forma visceral da doença (Teixeira *et al.*, 2014; Martinez, 2015).

A PCM é distribuída geograficamente em países da América Latina tais como Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (Brummer *et al.*, 1993). A grande maioria dos casos, no Brasil é reportada, principalmente, na região Sudeste, seguido das regiões Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste (Coutinho *et al.*, 2002). Alguns casos vêm sendo relatados nos EUA, Europa e Ásia, devido ao aumento do fluxo migratório de pessoas nas últimas décadas (Buitrago *et al.*, 2011).

O primeiro relato da PCM ocorreu, em 1908, pelo médico e cientista brasileiro Adolpho Lutz, o qual isolou e caracterizou o fungo em lesões de pacientes (Abreu E Silva *et al.*, 2013). Vários estudos apontam que no Brasil, a taxa de incidência desta micose esta associada a mudanças socioambientais. Dados epidemiológicos apontam que o índice de mortalidade decorrente da PCM varia entre 0.9-1.0 / 1.000.000 habitantes por ano, sendo assim responsável por 5% dos casos de letalidade causados por micoses (Martinez, 2010). Por ser uma doença de grande recidiva (resultando em sequelas anatômicas), estar associada com o custo socioeconômico, e por afetar indivíduos na idade produtiva (a grande maioria trabalhadores rurais), esta micose tornou-se uma importante doença ocupacional e um grave problema social.

Devido ao fato de não ser uma doença de notificação compulsória, o levantamento de dados precisos sobre a gravidade da doença é incompleto. Grande parte das informações adquiridas baseia-se em inquéritos epidemiológicos e relatos de casos clínicos. Alguns testes, tais como de sensibilidade intradérmica com paracoccidina, tem sido amplamente utilizados para estimar novos casos a cada ano (Coimbra Junior *et al.*, 1994; Fava and Netto, 1998; Coutinho *et al.*, 2002; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O fungo termodimórfico *P. brasiliensis* é encontrado a temperatura de 19-28°C como micélio filamentoso ou conídio. Seu estado leveduriforme, por sua vez, é

observado no tecido do hospedeiro ou em cultura a 33-37°C (San-Blas and San-Blas, 1982; Paris *et al.*, 1985). A infecção inicia-se por meio da inalação de conídios e/ou micélios filamentosos, que ao alcançarem os bronquíolos e alvéolos pulmonares, transformam-se em células leveduriformes infectantes, disseminando-se para os demais tecidos por via linfática e sanguínea, levando ao aparecimento de focos quiescentes com leveduras viáveis e formação de lesões (Fortes *et al.*, 2011). Após o contato com o fungo, a progressão e a gravidade da PCM depende da imunidade do hospedeiro (Ramos, 2004). Contudo, a virulência da cepa de *P. brasiliensis* é primordial para o estabelecimento de suas manifestações clínicas (Franco, 1987; Zhang *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas da PCM são classificadas como forma aguda e forma crônica (San-Blas and San-Blas, 1977; Franco, 1987). O comprometimento da imunidade celular específica (Benard *et al.*, 1996), esta correlacionada com a forma aguda e progressiva da doença (Oliveira *et al.*, 2002; Campanelli *et al.*, 2003). Contudo, em ambas as formas de PCM, a resposta imune pode ser ineficiente, resultando no alto índice de mortalidade na ausência de terapia (Brummer *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2002). A forma aguda ou subaguda, conhecida popularmente como forma juvenil e responsável por 20-25% dos casos que acometem as faixas etárias de 3 a 30 anos de idade, instala-se rapidamente e leva à lesões disseminadas que resultam na formação de úlceras muco-cutâneas (Benard, 2008). O acometimento pulmonar é menos frequente e lesões de mucosa de vias aéreas e digestivas são raras (Franco *et al.*, 1987; Mendes, 1994).

A forma crônica da PCM, ou tipo adulto, que acomete cerca de 75% à 80% dos adultos com idade superior a 30 anos, caracteriza-se pelo comprometimento dos pulmões e da mucosa orofaríngea, bem como das vias aéreas superiores. A forma crônica ocorre devido à reativação de focos quiescentes (Benard, 2008) e neste caso, a doença é menos grave, com lesões locais e o processo inflamatório é menor. Além disso, granulomas bem definidos podem estar presentes em uma grande variedade de tecidos, os quais são associados com a redução no número de fungos e nas sequelas fibróticas (Franco, 1987; Mendes, 1994). Uma terceira forma, denominada residual ou sequelar e reconhecida, recentemente, em pacientes tratados com drogas antifúngicas, caracteriza-se pelo aparecimento de sinais

clínicos tais como fibrose, enfisema pulmonar e síndrome de Addison (insuficiência renal) (Mendes, 1994; Vranjac, 2008).

A incidência da PCM em crianças de até 13 anos de idade é similar em ambos os sexos. Por outro lado, acomete indivíduos do sexo masculino com idade entre 30-59 anos em uma frequência de 7,2:1 (homem : mulher) (Moreto *et al.*, 2011). A menor prevalência de casos de PCM em mulheres ocorre devido ao hormônio feminino estrogênio. A presença de receptores do hormônio β -estradiol, no citoplasma do *P. brasiliensis*, é capaz de inibir a transição da forma saprofítica para patogênica (Salazar *et al.*, 1988; Coutinho *et al.*, 2002; Shankar *et al.*, 2011).

1.2 Resposta imune na paracoccidioidomicose

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), expressos em células do sistema fagocítico, ao detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) ativam vias de sinalização intracelular que induzem a produção de mediadores pró ou anti-inflamatórios (Medzhitov and Janeway, 2002). Atualmente, são descritas quatro classes de PRRs: receptores transmembranares do tipo *Toll* (*Toll like receptor* - TLR), receptores de lectina do tipo C (*C-type lectin receptors* – CLR), receptores citoplasmáticos do tipo RIG (*Retinoic acid- inducible gene- RLR*) e receptores *Nod* (*Nod like receptors* – NLRs). Uma vez ativados, tais receptores orquestram a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas através da sinalização intracelular via NF- κ B, MAPK, Syk e IRF (Akira *et al.*, 2006).

Os receptores do tipo *Toll*, expressos em linfócitos B e T, células NK (*natural Killer*), células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, são caracterizados por possuírem uma porção N-terminal, rica em repetições de leucina (*N-terminal leucine rich repeats- LRRs*), responsável pelo reconhecimento dos PAMPs e uma região transmembrana seguida por um domínio citoplasmático, denominado TIR, que desencadeia a sinalização intracelular dependente de moléculas adaptadoras Myd88 e/ou TRIF (Kawai *et al.*, 1999; Muraille *et al.*, 2003). Com aproximadamente 10 membros em humanos e 12 em camundongos, a disposição celular dos TLRs é amplamente variada: alguns são expressos na membrana plasmática como os TLR 1, 5, 6, e 10; outros se fazem presentes nos

endossomos como o TLR 3, 7, 9, e 11. TLR 2 e 4, por sua vez, podem estar presentes em ambos os compartimentos (Leifer and Medvedev, 2016).

Loures e colaboradores (2009, 2010) demonstraram que o reconhecimento do fungo *P. brasiliensis* por TLR2 e TLR4 aumenta a atividade fagocítica de macrófagos por induzir a síntese de óxido nítrico (NO) (Loures *et al.*, 2009; Loures *et al.*, 2010), fator microbicida cuja produção é potencializada por interferon-gama (IFN- γ) (Kurita *et al.*, 1999), fator estimulante de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF), IL-1 β e TNF- α (Kurita *et al.*, 2000). Assim, macrófagos peritoneais tratados, previamente, com IFN- γ e TNF- α , uma vez ativados, passam a produzir reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio, que são capazes de restringir o crescimento intracelular de *P. brasiliensis* (Gonzalez *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2008). Nesse mesmo sentido, camundongos tratados com anticorpo neutralizante para IFN- γ ou deficientes para esta molécula, tornam-se extremamente susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* (Cano *et al.*, 1998). Esta citocina atua, também, na indução de moléculas de adesão, como ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), que por sua vez, na PCM, favorecem a migração celular, a formação e/ou manutenção dos granulomas (Moreira *et al.*, 2006).

Estudos clínicos tem demonstrado que as formas disseminadas da PCM estão associadas com a elevação de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β e anticorpos IgE, IgG4 e IgA, e com a diminuição de IFN- γ . A resistência à PCM se dá pelo desenvolvimento do perfil de resposta Th1, com acentuada produção de IFN- γ e TNF- α , e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (Benard *et al.*, 1996; Benard *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2002; Campanelli *et al.*, 2003). Duas sub-populações oriundas de células T CD4⁺ são bem descritas, Th1 e Th2. Em geral, apesar de ambos os padrões de respostas serem observados durante infecções fúngicas, o predomínio da resposta Th1 correlaciona-se com a proteção e o perfil de resposta Th2, além de atenuar as respostas Th1, promove a ativação alternativa de fagócitos intensificando a disseminação fúngica (Romani, 2004). O perfil de resposta Th1, na PCM, é prevalente em fases iniciais, sendo associado às formas assintomáticas da infecção. Entretanto, após a interação persistente do fungo com o sistema imune do hospedeiro, o padrão de resposta dominante é o Th2 (Ramos and Saraiva Ldo, 2008).

Chiarella e colaboradores (2007) relataram que a deleção de linfócitos T CD4⁺ em animais susceptíveis não resulta em alteração na gravidade da doença, porém

reduz a produção de anticorpos contra o fungo. Em contraste, a depleção de células T CD8⁺, com anticorpo anti-CD8, leva a um aumento na carga fúngica. Deste modo, a carga fúngica é, principalmente, controlada pelas células T CD8⁺, enquanto que a produção de citocinas e anticorpos são regulados pelas células T CD4⁺ (Chiarella *et al.*, 2007). Entretanto, a última década uma nova linhagem de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A, denominada como células Th17, foi descrita. O desenvolvimento das células Th17, direcionado pelo fator de transcrição ROR γ T (*Retinoid-related orphan receptor*) (Ivanov *et al.*, 2006), é induzido pela presença de IL-6 e TGF- β e potencializado pela presença de IL-1 β (Veldhoen and Stockinger, 2006; Bettelli *et al.*, 2007). Apesar de intimamente relacionadas ao desenvolvimento de doenças autoimunes, as células de perfil Th17 também exibem um papel importante na resistência às doenças causadas por fungos (Romani, 2004). Durante a resposta imune à PCM, a expressão de TLR2 exerce um efeito negativo na resposta Th17 (Loures *et al.*, 2009). Pacientes com forma adulta ou crônica da PCM têm um predomínio do perfil de células Th17, comparado aos indivíduos controles e aos pacientes com a forma juvenil ou aguda da doença (De Castro *et al.*, 2013).

1.3 Resposta granulomatosa durante a PCM

Como resultado do estímulo persistente, a ativação da resposta imune durante a PCM, culmina na formação de estruturas granulomatosas que tentam impedir a proliferação e a disseminação fúngica (Franco, 1987). As células que participam deste processo inflamatório são neutrófilos, macrófagos, células epitelióides, células gigantes, linfócitos e fibroblastos (Kerr *et al.*, 1988; Defaveri *et al.*, 1989). O processo inflamatório granulomatoso consiste de três fases distintas: (1) **Fase monocítica – neutrofílica**, composta pela população mista de macrófagos e neutrófilos, e pela produção de TNF- α , decorrente do reconhecimento fúngico (Figueiredo *et al.*, 1993); (2) **Fase pré-granulomatosa**, caracterizada pela elevada quantidade de macrófagos no foco infeccioso, os quais dão origem às células gigantes; (3) **Fase granulomatosa**, mediada por linfócitos T, localizados ao redor do granuloma (Franco, 1987).

Sendo assim, pode-se categorizar estruturalmente o granuloma paracoccidióidico em duas zonas, central e periférica. Ademais, a zona central ainda

é subdividida em duas outras: a zona afibrilar, que abriga macrófagos, células epitelióides e células gigantes, e é circundada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e a zona fibrilar, mais externa, a qual é composta por fibras delgadas de colágeno tipo I e III, randomicamente dispersas. A área periférica do granuloma, por sua vez, rica em fibroblastos e matriz extracelular, é constituída, majoritariamente, por colágeno tipo I arranjado em feixes compactos e entrelaçados com finas fibras reticulares de colágeno do tipo III (Kerr *et al.*, 1988; Cock *et al.*, 2000)

Pacientes e camundongos que não possuem uma resposta imune celular adequada, formam granulomas frouxos, apresentam elevado número de leveduras viáveis nas lesões e, por isso, desenvolvem a doença grave e disseminada (Brummer *et al.*, 1993; Souto *et al.*, 2000). Uma citocina importante durante o processo de formação do granuloma é o TNF- α (Figueiredo *et al.*, 1993), que em conjunto com a IL-1 β , promove o *clearance* bacteriano em granulomas *in vitro* induzidos por *Mycobacterium tuberculosis* (Yamashiro *et al.*, 2016).

1.4 Síntese e liberação da IL-1 β

Inicialmente descrita por ser responsável pela resistência às infecções por microrganismos (Van Der Meer *et al.*, 1988), a interleucina -1 (IL-1) também exerce um papel importante na imunopatogênese de doenças inflamatórias, autoimunes, infecciosas e degenerativas (Garlanda *et al.*, 2013). A família da IL-1 é composta por 7 moléculas distintas entre si: IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ . A IL-1 β e IL-1 α ligam-se ao mesmo receptor (IL-1R1), porém são codificadas por genes distintos e exercem diferentes funções durante respostas inflamatórias (Garlanda *et al.*, 2013).

A síntese e liberação da IL-1 β são processos amplamente controlados e dependem de dois sinais distintos: **(1)** a indução transcricional de uma forma imatura via NF- κ B, a pró-IL-1 β ; **(2)** a proteólise mediada por caspase-1 para produzir IL-1 β ativa (Hise *et al.*, 2009). Assim, os receptores de reconhecimento padrão regulam a transcrição do gene IL-1 β , enquanto que o complexo multiprotéico pró-inflamatório, contendo receptores do tipo *Nod-like* (NLR) controlam a clivagem da pró-IL-1 β por intermédio da caspase-1 (Franchi *et al.*, 2006).

1.5 Receptores do tipo *Nod*

Os receptores do tipo *Nod* (NLRs) pertencem a uma família de proteínas citoplasmáticas, na qual a estrutura dos 20 membros descritos (Kufer *et al.*, 2005; Martinon and Tschopp, 2005) é composta, em sua maioria, por três domínios distintos: um domínio carboxil-terminal rico em leucina (LRR) que tem função de reconhecer o antígeno; um domínio NOD (NACHT) (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*), responsável pela oligomerização induzida pela ligação ao ATP; e um domínio variável N-terminal, que desencadeia a função efetora do receptor (Athman and Philpott, 2004; Meylan *et al.*, 2006; Wilmanski *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). De acordo com este domínio efetor N-terminal, os NLRs são classificados em: NLRBs (domínio BIR), NLRC/X (domínio CARD) ou NLRPs (domínio PYD) (Fritz *et al.*, 2006; Kuffer, 2008; Tschopp e Schroder, 2010) (**Figura 1**).

Na ausência de infecção, o NLR encontra-se em uma forma inativa, onde as regiões efetoras permanecem protegidas pela região LRR, a qual bloqueia sua atividade. O reconhecimento antigênico permite que o ATP se ligue ao domínio NOD e cause sua oligomerização, promovendo uma sinalização celular característica de cada NLR (Inohara *et al.*, 2005). Essa mudança conformacional do receptor expõe o domínio N-terminal que interage com a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis associated speck – like protein containing CARD*). A molécula ASC, por conter motivos de ligação PYD e CARD, associa-se, através da sua porção N-terminal PYD, aos receptores NLRP ou NLRC, mas também, liga-se, concomitantemente à caspase-1, por ligações homofílicas entre os domínios CARD, contidos em ASC e caspase-1, para formar a plataforma molecular denominada inflamassoma (Inohara *et al.*, 2005), descrita, inicialmente, por Jürg Tschopp em 2002 (Martinon *et al.*, 2002; Martinon *et al.*, 2009; Schroder and Tschopp, 2010).

Adaptado de (Geddes *et al.*, 2009)

Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura proteica dos receptores do tipo NOD (NLR). Os receptores NLRs são compostos por três domínios distintos: domínio C-terminal rico em regiões repetidas em Leucina (LRR), responsáveis pelo reconhecimento do ligante; o domínio de oligomerização NOD (NACHT), e um domínio efetor, que pode ser um domínio antigênico pirin (PYD), CARD (domínio de recrutamento de caspase) ou um domínio BIR (repetições IAP de baculovírus).

1.5.1 Inflamassoma

Etiologicamente, o termo inflamassoma é originado da palavra inflamação, que vem do latim *in* – dentro e *flamma*- chama, e do sufixo “soma”, que por significar *corpo* em grego, é utilizado na biologia celular para definir complexos protéicos, tais como proteossomas, lipossomas, ribossomas, dentre outros (Zou *et al.*, 1999). O reconhecimento antigênico permite que o ATP se ligue ao domínio NOD e cause sua oligomerização. Essa mudança na conformação do receptor permite que o domínio

efetor seja exposto, e então interaja com a proteína adaptadora ASC, levando ao recrutamento e ativação de caspases inflamatórias, como a caspase-1. A formação do complexo proteico entre receptor e proteína adaptadora é necessário para que haja a liberação das subunidades p10 e p20 da caspase-1 e o subsequente processamento da IL-1 β e IL-18 (Inohara *et al.*, 2005).

Na literatura são descritos diferentes tipos de inflamassoma, distinguidos pelos seus receptores, adaptadores e estímulos específicos. Dentre eles, o inflamassoma de NLRP1, que em resposta a toxina Anthrax medeia a secreção de IL-1 β (Averette *et al.*, 2009; Levinsohn *et al.*, 2012; Chavarria-Smith and Vance, 2013); o inflamassoma de AIM2 que é ativado frente a infecção por vírus de DNA (Burckstummer *et al.*, 2009; Hornung *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2009) ; o inflamassoma de RIG-I, que responde à RNA viral (Poeck *et al.*, 2010); o inflamassoma de NLRC4/IPAF que regula a resposta imune frente a bactérias intracelulares como *Salmonella typhimurium* (Franchi *et al.*, 2006), *Legionella pneumophila* (Amer *et al.*, 2006) e *Pseudomonas aeruginosa* (Sutterwala *et al.*, 2007), e o inflamassoma de Nlrp3 que é ativado por uma variedade de estímulos endógenos e exógenos (Kanneganti *et al.*, 2006; Dostert *et al.*, 2008)

1.5.1.2 Inflamassoma de NLRP3

O inflamassoma de Nlrp3, também conhecido como CIAS1, Cryopyrin, NALP3 ou Pypaf1, foi inicialmente associado, com o ganho de função sobre um gene, o qual, em humanos, desencadeava o desenvolvimento de um grupo de síndrome hereditárias autoinflamatórias, designadas como CAPS (*cryopyrin-associated periodic syndromes*), caracterizadas por erupções cutâneas e episódios recorrentes de febre (Hoffman *et al.*, 2001; Feldmann *et al.*, 2002).

Embora que constitutivo a expressão de NLRP3 é muito baixa em macrófagos e células dendríticas, podendo ser potencializado por intermédio de dois sinais: o primeiro sinal (*priming*) provém da ativação de PRRs por PAMPs oriundos de microrganismos, os quais via NF- κ B, induzem a expressão gênica de *nlrp3*, *il1b* e *il18* (Latz *et al.*, 2013). O segundo sinal (*ativação*) é desencadeado pelo ATP extracelular, efluxo de K⁺, sinalização de Ca²⁺, ROS, estresse mitocondrial, liberação de catepsina, toxinas formadoras de poros (Mariathasan *et al.*, 2006) RNAs virais

(Muruve *et al.*, 2008) entre outras moléculas (Lamkanfi and Dixit, 2009; He *et al.*, 2016).

Uma variedade de fungos é capaz de ativar o inflamassoma de NLRP3, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (Tavares *et al.*, 2015). Notavelmente, o *P. brasiliensis* é capaz de modular a ativação do inflamassoma de NLRP3 de maneira dependente do efluxo de potássio (K⁺), espécies reativas de oxigênio, acidificação fagolisossomal e liberação de catepsina B (Tavares *et al.*, 2013). Dados do nosso grupo demonstraram que animais deficientes para NLRP3 apresentam maior crescimento fúngico, granulomas desorganizados e uma diminuição de IL-18. Os dados também mostram uma redução na resposta do perfil Th1, acarretando em aumento da suscetibilidade destes animais frente a infecção por *P. brasiliensis* (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015).

Para que ocorra a formação do inflamassoma de NLRP3, é necessário o auxílio da proteína adaptadora ASC, que forma um *speack*, que são agregados perinucleares presentes no citoplasma, que se polimerizam, gerando filamentos que são recrutados no auxílio e liberação da forma ativa da caspase-1 (Liepinsh *et al.*, 2003). Toda via, alguns estudos revelam que ASC pode ser encontrada também no núcleo (Bryan *et al.*, 2009), e na mitocôndria (Subramanian *et al.*, 2013). No retículo endoplasmático (ER), o NLRP3 para associar-se com a ASC, leva a uma alteração na localização subcelular desses componentes, rearranjando-os, especialmente, de forma a aproximar a mitocôndria do ER para permitir a justaposição de ASC e NLRP3 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; Henao-Mejia *et al.*, 2012). Em sincronia a este processo, filamentos de pró-caspase-1 interagem por ligações CARD-CARD com a proteína ASC, levando a ativação auto-proteolítica da pró-caspase-1 através da clivagem do domínio CARD. Este processo resulta na formação de dois heterodímeros com domínios efetores p20 e p10, que são capazes de levar à maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (**Figura 2**) (He *et al.*, 2016).

Adaptado de (Mariathasan and Monack, 2007)

Figura 2. Ativação do inflamassoma de NLRP3. A ativação do inflamassoma de NLRP3 envolve duas etapas distintas. O primeiro sinal é proveniente da ativação de NF-κB via TLR através da ligação com o agonista, induzindo a expressão de genes de NLRP3 e citocinas levando ao aumento proteico. O segundo sinal de ativação envolve diversos estímulos tais como: ROS mitocondrial, efluxo de potássio, liberação de captepsina e estress mitocondrial. A interação do NLRP3 com proteína adaptadora ASC, em sua forma ubiquitinada e fosforilada, desencadeia a formação da plataforma molecular denominada inflamassoma. O inflamassoma é estruturalmente composto pelo receptor NLRP, e a proteína adaptadora ASC e caspase-1, através da interação do domínio CARD-CARD.

1.5.1.3 Inflamassoma de NLRC4

O inflamassoma de NLRC4 foi identificado com base em sua similaridade com APAF-1 (*apoptotic protease – activating factor-1*), molécula relacionada a apoptose, que tem habilidade de recrutar caspase-1 (Geddes *et al.*, 2001; Poyet *et al.*, 2001). O inflamassoma de NLRC4 regula a resposta imune contra bactérias intracelulares, como *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* e *Pseudomonas aeruginosa* (Mariathasan *et al.*, 2004; Amer *et al.*, 2006; Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006; Sutterwala *et al.*, 2007). Esta atividade é mediada pelo reconhecimento da flagelina (Kofoed and Vance, 2011; Lightfield *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Sua ativação por bactérias flageladas requer a expressão bacteriana das proteínas especializadas do sistema de secreção (SPI) do tipo III (T3SS) e do tipo IV Dot/Icm (T4SS), as quais

tem como função secretar fatores de virulência bacterianos do endossomo para dentro do citoplasma da célula hospedeira (Sun *et al.*, 2007; Lightfield *et al.*, 2008).

Entretanto, o inflamassoma de NLRC4 não interage diretamente com as proteínas bacterianas e, por isso, requer a participação de receptores *Nod-like* do tipo NAIP. Neste contexto, a flagelina é reconhecida diretamente por NAIP5 e NAIP6, presentes no endossomo. Após o reconhecimento bacteriano, pelos receptores acima citados, há o recrutamento de NLRC4, que por sua vez recruta caspase-1 e forma o inflamassoma de NLRC4 (**Figura 3**) (Kofoed and Vance, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Além disso, estudos recentes demonstram que o inflamassoma de NLRC4 pode ser ativado através de uma mudança na fosforilação da serina 533 do NLRC4, evento dependente do receptor do NAIP (Qu *et al.*, 2012).

Curiosamente, a bactéria *Shigella flexneri* ainda é capaz de ativar o inflamassoma de NLRC4 na ausência de flagelina (Sutterwala *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011), o que sugere a existência de outros agonistas, como as proteínas *rod* do sistema secretório T3SS (Miao *et al.*, 2010). Adicionalmente, o inflamassoma de NLRC4 está relacionado a gênese de doenças inflamatórias. Na síndrome auto-inflamatória familiar associada ao frio (FCAS), por exemplo, os episódios de erupções cutâneas e de febre após a exposição ao frio, são consequências de mutações de ganho de função no gene *Nlrc4*. Localizadas no domínio NOD, tais mutações promovem um aumento na afinidade de ligação entre monômeros de NLRC4, culminando na ativação exacerbada de caspase-1 e na intensa produção de IL-1 β (Kitamura *et al.*, 2014).

De maneira geral, presume-se que o inflamassoma de NLRC4 seja importante para a produção de IL-1 β e participe ativamente na eliminação de patógenos. No caso da infecção por *C. albicans*, animais *Nlrc4*^{-/-} apresentam uma maior mortalidade quando comparado aos camundongos selvagens e isso ocorre devido à diminuição na produção de IL-1 β e IL-17 e ao menor recrutamento de neutrófilos (Tomalka *et al.*, 2011). Todavia, durante a infecção por *S. typhimurium*, a produção de IL-1 β , pelo inflamassoma de NLRC4, não é necessária para o controle da infecção aguda (Matusiak *et al.*, 2015).

Pouco se sabe sobre o papel do inflamassoma de NLRC4 na defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis*. Especula-se que a falta de regulação dos inflamassomas possa estar associada com a patogênese da doença causada por

esse fungo. Considerando o potencial efeito modulador dos inflamassomas nas respostas imunes contra patógenos, a elucidação dos mecanismos responsáveis pelo controle das infecções contribuirá para a elaboração de novas estratégias para intervenção clínica.

Adaptado de (Mariathasan and Monack, 2007)

Figura 3. Ativação do inflamassoma de NLRC4. O inflamassoma de NLRC4 é responsável pelo reconhecimento de bactérias gram-negativas, as quais possuem estruturas que subvertem as funções das células hospedeiras, como a secreção de proteínas de agulha T3SS, proteína da haste interna, PRgJ e a flagelina via sistema de secreção do tipo III (T3SS). Essas proteínas quando injetadas no citoplasma são reconhecidas pelos receptores NAIPs. NAIP5 ou NAIP6 ligam-se diretamente a flagelina, enquanto que NAIP2 interage com PrgJ. A ligação com os NAIPs resulta na oligomerização do NLRC4 que recruta caspase-1 que é necessária para o processamento de IL-1 β e IL-18.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do inflamassoma de NLRC4 durante a infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2 Objetivos específicos

Determinar se a produção de IL-1 β e ativação de caspase-1 induzida por *P. brasiliensis* é dependente do inflamassoma de NLRC4;

Determinar a relevância do inflamassoma de NLRC4 no controle antifúngico e no desenvolvimento da resposta granulomatosa durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Analisar *in vivo* a influência de NLRC4 na indução das respostas Th1, Th17 e na sua migração de neutrófilo após infecção por *P. brasiliensis*.

3. Material e Métodos

3.1 Cultura de leveduras de *P. brasiliensis*

Amostras de isolados da cepa 18 de *P. brasiliensis* (Pb18), foram cultivadas em meio solido BHI (*Brain Heart Infusion*)- ágar, suplementado com 5% de soro fetal bovino e glicose durante 7 dias à 36°C.

3.2 Meio BHI (*Brain Heart Infusion*)-ágar

Em 500 mL de água destilada foram adicionados 26g de infuso cérebro-coração ágar (BHI – Sigma-Adrich), 5g de D(+) Glicose Anidra (C₆H₁₂O₆) (Merk) em seguida o meio foi submetido ao processo de esterilização (15 minutos à 121°C). Ao atingir uma temperatura de aproximadamente 45°C adicionou-se gentamicina (48µg/mL) e 25 mL de soro fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies, Inc). Subsequentemente, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis descartáveis (90 x 15 mm, Corning, NY, EUA) e estocadas a 4 °C.

3.3 Preparo de leveduras para inóculo

Após o período de cultura, as colônias do isolado 18 de *P. brasiliensis* foram transferidas para uma garrafa de cultura contendo meio F12 (pH 7,2), DMEM ou meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas à 37°C sob agitação à 150 rpm por 24 horas. A suspensão fúngica foi centrifugada à 400g e ressuspendida em PBS estéril para contagem em câmara de Neubauer. A concentração de células fúngicas foi ajustada para 1x10⁷ leveduras/mL em PBS estéril, sendo que 100µL dessa solução foi inoculado em cada animal.

3.4 Viabilidade das leveduras

Para determinar a viabilidade das células leveduriformes, 100µL da suspensão do fungo, em PBS, foi incubada durante 10 minutos em estufa de CO₂ a 5%, a 37°C, com 100 µL de diacetado de fluoresceína (DAF) (2mg/mL) e 100µL de brometo de

etídeo (50mg/mL). A contagem de leveduras viáveis foi determinada através da análise de fluorescência das leveduras marcadas, utilizando o microscópio de fluorescência. Sabe-se que as leveduras viáveis tem a propriedade de acumular fluoresceína (Fluocromasia) enquanto que o brometo de etídio penetra rapidamente em células danificadas, ligando-se ao DNA por intercalação, formando um complexo vermelho fluorescente com o material nuclear da levedura (Calich *et al.*, 1979). Desse modo uma boa viabilidade foi considerada quando aproximadamente 90% das leveduras eram DAF positivas.

3.5 Animais experimentais e infecção com Pb18

Camundongos selvagens C57BL/6 (WT) e deficientes para NLRC4 (*Nlrc4*^{-/-}) no mesmo background que os selvagens, foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Para a realização da infecção, camundongos de 6 a 7 semanas de idade foram inoculados intravenosamente, pelo plexo orbital (agulha 8 mm comprimento, calibre 0,3mm), com 100µL de solução contendo 1x10⁶ leveduras viáveis de Pb18. Os experimentos foram realizados utilizando no mínimo 4 animais por grupo. Todos os experimentos foram desenvolvidos de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP (processo 046/2015, **Anexo 1**).

3.6 Recuperação de fungos e contagem de unidades formadoras de colônias (CFU)

Fragmentos do pulmão, fígado e baço foram retirados dos camundongos infectados por *P. brasiliensis* aos 0, 7, 15, 30 dias após a infecção. Posteriormente, estes órgãos foram pesados e homogeneizados em solução inibidora de protease (Complete®, Rocher, Mannheim, Alemanha), diluída em PBS estéril, com o auxílio do triturador de tecidos (IKA® - Werk; Deutshchland Germany). 50µL do macerado foi diluído em 450µL de PBS estéril e, em seguida, 100µL da amostra foi semeada em placas de Petri estéreis descartáveis (90 x 15mm, Corning, NY, EUA) contendo meio BHI-ágar enriquecido com 48µg/mL de gentamicina, 5% de soro fetal bovino e 5g de D(+) Glicose Anidra (C₆H₁₂O₆) (Merk). As placas foram mantidas por um período de

7 dias a uma temperatura média de 36°C e a recuperação de fungos viáveis determinada através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Os valores foram expressos como CFU/ grama de tecido.

3.7 Análise histopatológica

Os órgãos (pulmões, fígado e baço) foram coletados de camundongos infectados por *P. brasiliensis* aos 0, 7, 15 e 30 dias após a infecção. Fragmentos destes tecidos foram fixados em formol tamponado e, após 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70-100%) e clarificados em xilol. Os órgãos foram inclusos em blocos de parafina e cortes de 5µm de espessura foram obtidos com o auxílio do micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados à 59-60°C para fixação. O material foi lavado em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratado com concentrações decrescentes de etanol (do absoluto ao 80%). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise da formação dos granulomas com prata para identificação do fungo no tecido e para marcação de fibras de reticulina ou com picrossírius, para marcação de colágeno total. As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil), cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio óptico comum acoplado à câmara digital (Olympus).

3.8 Imunohistoquímica (IHQ)

Para a detecção de *iNOS* e *IL-1β* utilizou-se a técnica de IHQ, realizada em camundongos C57BL/6 e *Nlrc4^{-/-}* infectados por *P. brasiliensis*. A reação foi realizada em cortes de 5µm de tecido pulmonar parafinado. Inicialmente a parafina foi removida dos cortes histológicos, os quais foram hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). A recuperação antigênica foi realizada a 42°C, durante 30 minutos, utilizando tampão citrato pH=6,0. A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação em água oxigenada 3%, por 20 minutos, antes dos cortes serem submetidos a três lavagens de 3 minutos com PBS para a marcação de *iNOS* e *IL-1β*. O bloqueio da avidina e biotina endógena foram realizados com o uso do kit de bloqueio avidina/biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) seguida de duas lavagens com PBS com saponina a 0,01%. Para o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas foi utilizado BSA (albumina

sérica bovina) 1% durante 30 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* à 4°C com anticorpos específicos para iNOS (sc-649 - Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) e para IL-1 β (Abcam- 9722), ambos diluídos em PBS saponina 0,01%.

Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas por 45 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories). Posteriormente, foi adicionado o complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, os cortes foram lavados com PBS-saponina 0,01% e a reação, revelada pela adição de substrato diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories), foi interrompida com água. As lâminas, contra - coradas com hematoxilina por 3 minutos, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e desidratada (álcool 80%, álcool 90% e xilol por 3 minutos cada) e montadas com Bálsamo de Canadá (Vetex Química, Rio de Janeiro, Brasil).

3.9 Extração de RNA total

Lóbulos pulmonares e macrófagos de camundongos C57BL/6, *Nlrc4*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} infectados ou não com *P. brasiliensis* foram obtidos e armazenados à -20°C em 500 μ L Trizol[®] (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) até o momento da extração de RNA total. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma haste de trituração autoclavada e tratada com dimetilpirocarbonato (DEPC), para eliminação de RNase. À mistura foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. Após centrifugação (12000g, 15 minutos, 4°C), a fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente coletada, transferida para outro tubo contendo 200 μ L de etanol 70% e para a purificação do RNA foi utilizado o kit SV total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA).

Essa mistura foi posteriormente, pipetada sobre uma coluna contendo membrana de sílica acoplada a um tubo coletor e centrifugada à 1300g por 2 minutos à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 600 μ L da solução RNA Wash Solution (Promega) rica em etanol e centrifugada por 13000g por 1 minuto a temperatura ambiente. O líquido centrifugado foi descartado do tubo coletor e a DNase I e o MgCl₂ preparados foram aplicados diretamente sobre o centro da membrana por 15 minutos à temperatura ambiente. A DNase foi inativada pela

adição de *DNase Stop Solution* (Promega) antes da coluna ser centrifugada a 13000g por 1 minuto à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com a solução *RNA Wash Solution*, os tubos coletores foram trocados por tubos identificados e o RNA eluído em 50µL de água livre de RNase depois da centrifugação de 13000g por 2 minutos à temperatura ambiente. O RNA foi quantificado a 260nm de absorbância (A_{260}) em *NanoDrop™ 1000 Spectrophometer V 3.7.1* (Thermo Scientific) e armazenado a -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.10 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Uma mistura contendo 10x *RT Buffer*, 25x *dNTP Mix* (100mM), 0,05µg/µL de Oligo (dT) a 50µM, *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e 1µg de RNA foi colocada no termociclador (Modelo PTC-100, M Research, Watertown, MA, EUA) cujas temperaturas e tempos de incubação foram de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 10°C até a retirada da amostra. Posteriormente, a mistura foi diluída em 180µL de água livre de endonuclease e armazenada à -20°C até o uso.

3.11 Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

A avaliação do nível de transcritos foi realizada no pulmão de camundongos C57BL/6, *Nlrc4^{-/-}* e *Nlrp3^{-/-}*, infectados ou não com *P. brasiliensis* no período de 0, 7, 15 e 30 dias após a infecção, utilizando-se o sistema SYBR® Green e o *StepOnePlus Real- Time PCR System* (Applied Biosystems). Esse sistema realiza reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras através da expressão normalizada com base no controle endógeno/constitutivo β -2 microglobulina. Iniciadores adequados para tais reações, também conhecidos como *primers*, foram criados a partir do programa *Primer Express* (Applied Biosystems) e suas sequências estão dispostas no **Anexo 2**. O cDNA de cada amostra (5µL) foi adicionado a 0,5µL dos *primers* (sense/anti-sense) e a 2,5 µL de água livre de

endonucleases. A amplificação das sequências dos genes alvo e controle interno (β -2 microglobulina) foi avaliada através da curva exponencial gerada após a incubação do material a 50°C por 2 minutos, a 95°C por 2 minutos (para desnaturação), 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos (para anelamento das sequências iniciadoras), 72°C por 30 segundos e, finalmente, 72°C por 30 segundos.

A positividade da reação foi determinada baseando-se em controles negativos, não infectados. A expressão gênica foi analisada e quantificada com base no valor da linha de corte C_t (*quantification Cycle*), definido após o término da reação, ou seja, a partir do ciclo em que a amplificação atingiu um limiar. Os cálculos, para determinação da expressão relativa dos genes alvo, foram realizados de acordo com as instruções contidas no folheto *User's Bulletin* (P/N 4303859, Applied Biosystems), sendo que os dados foram normalizados em relação à expressão constitutiva de β -2 microglobulina em cada amostra. Em resumo, foram obtidos os valores de ΔC_t para cada amostra avaliada, sendo que $\Delta C_t = C_{t\text{gene alvo}} - C_{t\text{gene controle } (\beta\text{-2 microglobulina})}$. Assim, quanto menor o valor de ΔC_t , maior a expressão do gene de interesse em relação ao gene controle. A expressão de mRNA amostral, em relação ao grupo controle de animais não infectados, foi calculada através da fórmula: Expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{animal infectado}} - \Delta C_{t\text{grupo controle}}$.

3.12 Obtenção do homogenato pulmonar

Fragmentos de pulmão foram coletados nos dias, 0, 7, 15 e 30 após a infecção em tubos criogênicos contendo 1 mL de solução inibidora de protease (Complete®, Rocher, Mannheim, Alemanha) preparada conforme recomendação do fabricante. Em seguida, os órgãos, lisados por homogeneização com triturador mecânico (IKA®-Werke; Alemanha), foram centrifugados à 1600g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de citocinas.

3.13 Dosagens de citocinas por ELISA

As concentrações de citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-1 β , IL-17, TNF- α , IL-12p40) no homogenato pulmonar e no sobrenadante de cultura de macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos C57BL/6, *Nlrc4*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-}, infectados ou não com *P. brasiliensis*, foram mensuradas por ELISA conforme instruções do fabricante. Brevemente, placas de poliestireno de 96 poços (Costar, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas a temperatura ambiente ou 4°C por 18 horas com tampão de ligação contendo anticorpo de captura (50 μ L/ poço). Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e os sítios não específicos foram bloqueados, por 2 horas a temperatura ambiente, com 100 μ L/poço de tampão de bloqueio específico. Posteriormente, diluições dos padrões (curva padrão) e das amostras foram adicionadas à placa (50 μ L/ poço). Após 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e anticorpos de detecção biotinilados, diluídos segundo orientações do fabricante, foram adicionados (50 μ L/ poço). Solução contendo substrato cromógeno da peroxidase, *treta-methyl-benzidine* (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, EUA) foi adicionado em cada poço por 30 minutos, quando a reação foi finalizada pela adição de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica de cada amostra foi mensurada por meio do leitor de ELISA (eMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em filtro com comprimento de onda de 450nm e a quantificação foi realizada conforme curva padrão obtida.

3.14 Dosagem de IL-18 por ELISA

A concentração de IL-18 no homogenato pulmonar de animais C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-} foram mensurados por ELISA (*Mouse IL-18 ELISA kit* – code 7625 MBL) conforme instruções do fabricante. Este ensaio utiliza dois anticorpos monoclonais contra dois epítomos diferentes da IL-18 de camundongo. Na placa já sensibilizada com anticorpo monoclonal anti-IL-18, o padrão designado pelo fabricante (curva padrão) e as amostras foram adicionadas (100 μ L/ poço) e, após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada com *Wash solution* antes da adição do anti-IL-18 conjugado à peroxidase. Após a adição de anti-IL-18 as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas com *Wash solution* e em seguida foi adicionado o substrato de peroxidase, indicado pelo fabricante, durante 30 minutos. Posteriormente, uma solução ácida (0,5mol/L H₂SO₄),

denominada *Stop Solution*, foi adicionada para finalizar a reação enzimática e estabilizar a cor antes da leitura da densidade óptica (O.D.). A leitura dos poços foi mensurada usando filtro com comprimento de onda de 450nm e a quantificação de IL-18 foi calibrada a partir da curva com os padrões de referência.

3.15 Obtenção de leucócitos do pulmão

Para digestão do tecido, os pulmões fragmentados foram incubados durante 45 minutos a 37°C em RPMI-1640 com 500mg/mL de Colagenase I (Gibco) e 1mg/mL de DNase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após esse período, os fragmentos restantes foram macerados e passados através de poros de 50µm e a suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* adicionou-se 1 mL de tampão de lise. Após 2 minutos, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 1X, centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuspendidas em 2 mL de RPMI-completo. Aliquotas celulares foram diluídas 100x em azul de Tripán e a contagem de leucócitos efetuada em câmara de Neubauer. Em seguida, distribuiu-se 10⁶ células por tubo para análise fenotípica por citometria de fluxo.

3.16 Citometria de fluxo

A análise da expressão de marcadores intracelulares e de superfície, no intuito de caracterizar a população de linfócitos T, foi realizada em leucócitos recuperados do pulmão (30º dia de infecção) de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Para tal fenotipagem, avaliamos os subtipos celulares de acordo com a expressão das moléculas: CD3, CD4, CD8 IFN-γ e IL-17. Para isso, 10⁶ células/poço semeadas em placas de cultura com 48 poços (Corning, New York, EUA) foram estimuladas com 50ng/mL de PMA (acetato de formol miristato), 500ng/mL de ionomicina e 1µL de *BD Golgi Plug*TM (Becton Dickinson) por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido o período de incubação, as células foram submetidas à fixação com PBS-formol 4% por 11 minutos, lavadas e permeabilizadas com tampão contendo soro fetal bovino a 1% (Gibco, Life Technologies), saponina a 0,5% (Sigma-Aldrich) e azida de sódio a 0,1% (MERCK S.A. Indústrias Químicas,

Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após 30 minutos de bloqueio de ligações inespecíficas com soro de coelho 10%, anticorpos de superfície, tais como CD3 conjugado a FITC (clone: 145-2c11), CD4 conjugado a Pacific Blue (clone: RM4-4), CD8 conjugado a PECy7 (clone: 53-6.7), e anticorpos para proteínas intracelulares, como IFN- γ conjugado a APC (clone: XM61.2) e IL-17A conjugado a PE (clone: TC1118410) foram adicionados às amostras. As células foram armazenadas a 4°C ao abrigo da luz por 30 minutos e, em seguida, realizou-se repetidas lavagens com PBS 1X. Por fim, após a última centrifugação de 1 minuto a 8000 rpm, as células foram ressuspendidas em 100 μ L de PBS-formol a 1%. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (FACs canto II) e as análises foram feitas com o auxílio do programa *FlowJo* (FlowCytometry Analysis Software v10.0.8).

3.17 Diferenciação de macrófagos a partir de medula óssea

Macrófagos diferenciados de células precursoras de medula óssea (BMDM) foram utilizados em experimentos *in vitro*. As células precursoras de macrófagos, obtidas da medula óssea de fêmures e tíbia de camundongos C57BL/6, *Nlrp4*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-} e *Asc*^{-/-}, foram cultivadas em meio RPMI 20/30 composto por 20% de soro fetal bovino (GIBCO), 30% do sobrenadante de cultivo de células L929(LCCM), 100 unidades/mL de penicilina G potássica e estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 2mM de L-glutamina, conforme protocolo previamente descrito por (Warren and Vogel, 1985). Os camundongos foram eutanasiados e seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos, seccionados em ambiente estéril e lavados com meio RPMI incompleto (BioWhittaker®, Lonza, Walkersville, MD, USA) utilizando seringa acoplada à agulha 13x4,5mm. As células recém-colhidas foram diluídas em meio RPMI 20/30, distribuídas em placas de petri de dimensões 100x20mm (Corning Incorporated, USA) e incubadas, por 4 dias, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. No quarto dia, um total de 10 mL de meio RPMI 20/30 acrescentado à cultura, sendo que no 7º dia, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS gelado. As células foram plaqueadas em placa de 6, 12, 24, ou 96 poços, em meio RPMI 10/5 suplementado com 10% soro fetal bovino (GIBCO), 5% de meio condicionado de células L929 (LCCM), 100

unidades/mL de penicilina G potássica e estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 2mM de L-glutamina.

3.18 Marcação de caspase-1 ativa

Para avaliarmos a ativação da caspase-1, 1×10^6 macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6, *Nlrc4*^{-/-} e *ASC*^{-/-} foram infectados por *P. brasiliensis* durante 12 horas com MOI 1 (1 levedura/macrófago). Os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado e transferidos para tubo de polipropileno. A marcação da caspase-1 foi feita por 1 hora com reagente FLICA (FAM-YVAD-FMK, Immunochemistry Technologies, LLC), conforme recomendação do fabricante. Após esse período, as células foram lavadas por cinco vezes com PBS/Soro fetal bovino 10% e a aquisição das mesmas foi realizada em no citômetro de fluxo FACSCantoll (BD). Os dados foram analisados por meio do software “FlowJo” (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

3.19 Westerns blotting

Para avaliar a expressão de IL-1 β e NLRP3, 1×10^6 BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6, *Nlrc4*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram plaqueados em placas de 48 poços e infectados por *P. brasiliensis* na proporção de 5 fungos por célula (MOI 5) durante um período de 48 horas. Após esse período, o sobrenadante e o lisado da cultura, coletados em tampão Laemmli (50mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 2,5% β -mercaptoetanol) para análise de IL-1 β e NLRP3, respectivamente, foram fracionados em SDS-PAGE (gel de 18% para IL-1 β e 8% para NLRP3) e transferidos para membranas de nitrocelulose (0,22 μ M, GE Healthcare). Posteriormente, a membrana, bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente em tampão de bloqueio (PBS+ 5% de leite desnatado (Molico® - Nestlé) + 0,05% Tween 20), foi incubada, por 18 horas à 4°C sob agitação, com os anticorpos anti-IL-1 β (Abcam) e anti-NLRP3 (mAb Cryo-2 – AdipoGen) diluídos 1:250 (IL-1 β) e 1:500 (NLRP3) em PBS + 0,01% BSA). A membrana foi lavada 5 vezes por 10 minutos com TBS-T (TBS – 0,1% Tween 20®) antes da adição do anticorpo

secundário biotilado (Vector Laboratories) (diluído 1:3000 em PBS + 0,01% BSA) por 45 minutos à temperatura ambiente. Após 5 lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada com o reagente *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) e as bandas reveladas pela exposição da membrana ao aparelho *Amersham Imager 600 – GE Healthcare Life Sciences®*.

3.20 Avaliações da atividade fungicida

Para avaliar a atividade fungicida, BMDM de camundongos C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-} foram tratados *overnight*, a 37°C em estufa de CO₂, com 50 ng/mL de recombinante murino de IFN-γ (Invitrogen). O sobrenadante foi retirado e os BMDM foram infectados com MOI 1:25 (1 levedura/ 25 macrófagos). Após 4 horas de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com RMPI– 1640, para remover as leveduras não fagocitadas, e em alguns poços foram adicionados 200μL de PBS-saponina a 0,05%, para lise celular. Uma alíquota de cada um desses poços foi plaqueada em BHI, sendo que as unidades formadoras de colônia (CFU), contadas no período de 4 horas, foram consideradas como controle da internalização das leveduras, ou seja, fagocitose. Após este período, as células semeadas nos demais poços foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas. O sobrenadante destas culturas foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess. As células aderentes foram lisadas com 200μL de PBS-saponina a 0,05% e a recuperação de leveduras viáveis foi avaliada nas placas de BHI mantidas em estufa a 37°C por 7-15 dias. A atividade fungicida foi calculada de acordo com a fórmula: $[100 - (\text{UFC experimental} \times 100 / \text{UFC controle})]$, onde UFC controle é equivalente ao UFC de 4 horas de incubação (fagocitose) e UFC experimental corresponde ao UFC de 48 horas de incubação (*killing*).

3.21 Produções de NO

A produção *in vitro* de nitrito (NO₂⁻), avaliada no sobrenadante da cultura de BMDM de animais C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-}, estimulados ou não com 50 ng/mL de rIFN-γ (Invitrogen) e infectados por 48 horas com *P. brasiliensis*, foi mensurada pelo método de Griess (Miranda *et al.*, 2001). A reação foi lida em leitor de placas

(EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA), utilizando o comprimento de onda de 540nm, e os resultados foram expressos em mM tomando como base de comparação os valores de concentração obtidos pela curva-padrão de nitrato de sódio (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil) (as concentrações da curva-padrão variavam de 200 a 0,9µM).

3.22 Análise estatística

Os resultados, analisados com o auxílio do *GraphPadPrism* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), foram representados através da média + desvio padrão (SD), sendo as diferenças estatísticas determinadas pela análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) seguida do pós-teste de *Tukey*. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de *p* igual ou menor a 0,05.

4. Resultados

4.1 Os inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 são expressos durante a infecção *in vitro* por *P. brasiliensis*.

Sabe-se que *P. brasiliensis* é reconhecido pelos receptores TLR2 e TLR4 (Bonfim *et al.*, 2009; Acorci-Valerio *et al.*, 2010), os quais, através da molécula adaptadora MyD88, induzem a produção de citocinas inflamatórias (Loures *et al.*, 2011). De fato, animais *Myd88*^{-/-} apresentam uma redução significativa na produção de IL-12 e IL-1 β , mas não abolida, sugerindo a participação de outros receptores nesse processo. Adicionalmente, demonstramos que a infecção por *P. brasiliensis* leva a ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β , a qual é parcialmente dependente do inflamassoma de NLRP3 (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015).

Com intuito de averiguar se o *P. brasiliensis* é capaz de modular a expressão e ativação do inflamassoma de NLRC4, macrófagos foram diferenciados de precursores da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 e cultivados na presença ou ausência de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* durante 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Após estes períodos, a expressão do mRNA para NLRC4 foi determinado por PCR em tempo real. Observamos que a expressão do receptor *Nlrc4* aumentou após 6 horas de infecção, enquanto o receptor NLRP3 apresentou um pico de expressão inicial com 2 horas de incubação. Ao comparar a cinética de ambos os genes, percebemos que apesar do declínio de expressão ao longo da infecção, os receptores NLRC4 e NLRP3 são inversamente expressos nos tempos de 6 e 2 horas, indicando uma possível regulação negativa entre os mesmos (**Figura 4A**). Com o objetivo de validar os resultados obtidos por PCR, a análise por *western blotting*, nos revelou que a nível protéico, o receptor de NLRP3 é mais expresso, em macrófagos WT, após 12 horas de desafio com o fungo, tendo uma diminuição com 24 horas e deixando de ser detectado após 48 horas (**Figura 4B**).

Sabe-se que a ativação do inflamassoma está diretamente relacionada com a ativação de caspase-1 (Franchi *et al.*, 2009), a qual, por sua vez, é requerida para a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas maduras e biologicamente ativas (Gu *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 2005; Wilmanski *et al.*, 2008). Na tentativa de relacionar a expressão dos inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 com a expressão de IL-1 β e IL-18, utilizamos a mesma cinética experimental de estímulo com Pb18 para analisar a expressão relativa de *Il1 β* e *Il18*. Nossos dados mostram que, 12 e 24

horas após a infecção ocorreu uma expressão robusta de IL-1 β quando comparado à IL-18, a qual não alterou durante os períodos analisados (**Figura 4C**). Em conjunto, esses dados demonstram que os receptores NLRC4 e NLRP3 apresentam um padrão distinto de expressão, e que a expressão destes é inicialmente requerida para posterior expressão das citocinas relacionadas com a ativação do inflamassoma IL-1 β e IL-18.

Figura 4. A infecção por *P. brasiliensis* modula a expressão dos inflamassomas de NLRC4 e NLRP3. (A) Macrófagos diferenciados a partir de precursores da medula óssea (BMDMs) de camundongos WT foram cultivados na presença ou não de leveduras viáveis de Pb18 por 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas com MOI 5:1. O lisado celular foi coletado e a expressão gênica de *Nlrp3* e *Nlrc4* foi mensurada por PCR em tempo real. (B) BMDMs de camundongo WT foram cultivados na presença ou ausência de *P. brasiliensis*, MOI 5. Após 6, 12, 24 e 48 horas, a subunidade p130 do *Nlrp3* foi detectada por *Western blotting*. (C) Utilizando-se a mesma cinética de cultivo e infecção de macrófagos da figura A, a expressão gênica de IL-1 β e IL-18 foi mensurada por PCR em tempo real. Os resultados são representativos de dois experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação aos respectivos genes endógenos, rt-PCR (β -2 *microglobulin*) e *Western blotting* (β -actina), juntamente com o controle não infectado.

4.2 A ativação do inflamassoma de NLRC4 modula a produção de IL-1 β durante a infecção *in vitro* por *P. brasiliensis*.

Inicialmente, o inflamassoma de NLRC4 foi denominado como uma plataforma molecular que ativa caspase-1 em resposta ao reconhecimento da flagelina bacteriana de *Legionella pneumophila* por NAIP5 (Zamboni *et al.*, 2006). Entretanto, alguns estudos demonstraram que bactérias que não possuem flagelina, assim como estímulos relacionados à dor, são capazes de ativar o inflamassoma de NLRC4 (Sutterwala *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011). Como a ativação do inflamassoma culmina na ativação de caspase-1 e na secreção de IL-1 β e IL-18 (Case *et al.*, 2009), avaliamos se o inflamassoma de NLRC4 seria capaz de modular a produção de IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Nossos resultados revelaram que BMDMs de camundongos *Nlrc4*^{-/-} possuem elevada produção de IL-1 β quando comparado a macrófagos provenientes de animais WT (**Figura 5A**), o que correlacionou com o aparecimento da subunidade de 17 kDa da IL-1 β , indicativo de processamento da pró-IL-1 β , ou seja, conversão em sua forma ativa. Como controle do experimento foram utilizados BMDMs oriundos de camundongos *Nlrp3*^{-/-}, os quais apresentam uma diminuição da IL-1 β clivada durante a infecção por *P. brasiliensis* (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015) (**Figura 5B**). Ademais, quando esse mesmo sobrenadante de cultura foi utilizado para mensurar TNF- α , citocina pró-inflamatória produzida independente da ativação do inflamassoma, nenhuma diferença significativa foi observada entre macrófagos WT e *Nlrc4*^{-/-}, demonstrando que o inflamassoma de NLRC4 atua exclusivamente na produção de IL-1 β (**Figura 5C**).

A clivagem da IL-1 β em sua forma madura e biologicamente ativa requer o envolvimento da caspase-1 (Lamkanfi and Dixit, 2014). Desta maneira, nos questionamos se o aumento na clivagem de IL-1 β em BMDMs *Nlrc4*^{-/-} seria uma consequência da maior ativação de caspase-1. A fim de investigar essa hipótese, macrófagos WT, *Asc*^{-/-} e *Nlrc4*^{-/-} infectados por 12 horas com *P. brasiliensis* foram marcados com a sonda fluorescente Flica (5-carboxifluorescein-YVAD – FAM-YVAD), a qual se liga com alta afinidade à forma ativa da caspase-1 (SMOLEWSKI *et al.*, 2001). Observamos que macrófagos *Nlrc4*^{-/-} apresentaram uma porcentagem de células Flica⁺ semelhante ao tipo selvagem, demonstrando que a deficiência do

inflamassoma de NLRC4 não influencia na ativação de caspase-1 (**Figura 2D**). Como controle do experimento foram utilizados BMDMs oriundos de camundongos *Asc*^{-/-}. A proteína adaptadora ASC sinaliza em conjunto com o inflamassoma de NLRP3 para ativar caspase-1 durante a infecção por *P. brasiliensis* (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). Estes resultados demonstram que o inflamassoma de NLRC4 regula a produção de IL-1 β induzida por *P. brasiliensis*, mas não contribui para a ativação de caspase-1.

Figura 5. A produção *in vitro* de IL-1 β é regulada pelo inflamassoma de NLRC4 em macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. (A) BMDMs de camundongos C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-} foram cultivados na presença ou não de leveduras viáveis de Pb18 por 48 horas na proporção de 5 fungos/1 macrófago. O sobrenadante das culturas foi coletado e a dosagem de IL-1 β realizada por ELISA. (B) BMDMs de camundongos C57BL/6, *Nlrc4*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram cultivados na presença ou ausência de *P. brasiliensis*, MOI 5. Após 48 horas, a subunidade p17 da citocina foi detectada por *western blotting*. (C) BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-} foram cultivados na presença ou ausência de *P. brasiliensis* (MOI 5) e, após 48 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e a dosagem de TNF- α foi realizada por ELISA. (D) Macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6, *Asc*^{-/-} e *Nlrc4*^{-/-} foram colocados em contato com o fungo *P. brasiliensis* (1 fungo por célula) e, após 12 horas, a ativação de caspase-1 ativa foi determinada. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, deficiente *versus* WT.

4.3 Os inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 atuam de maneira distinta durante a infecção *in vitro* por *P. brasiliensis*.

A ativação do inflamassoma de NLRP3 é necessária para a produção de IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis* (Tavares *et al.*, 2013; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). Portanto, avaliamos se o aumento da produção de IL-1 β em BMDMs de animais *Nlrc4*^{-/-} seria resultante da robusta expressão do inflamassoma de NLRP3. Assim, BMDMs de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} foram infectados com leveduras viáveis de Pb18 e após 0, 2, 4, 6, 12, 24 horas de incubação, a expressão de mRNA para NLRP3 foi determinada por PCR em tempo real. Observamos um aumento na expressão gênica de NLRP3 em BMDMs de camundongos *Nlrc4*^{-/-} após 2, 6 e 12 horas de infecção com Pb18 quando comparado ao grupo controle (**Figura 6A**). Adicionalmente, realizamos a mesma cinética de infecção em macrófagos WT e *Nlrc4*^{-/-} e avaliamos os níveis proteicos de Nlrp3 por *western blotting*. Comparado ao controle endógeno, observamos uma diminuição de NLRP3 em macrófagos WT após 6 horas de infecção, seguido de um aumento notável com 12 horas e diminuição com 24 horas. Entretanto de maneira oposta, macrófagos deficientes para *Nlrc4*^{-/-} após 6 horas de desafio com o fungo apresentam um aumento de Nlrp3, acompanhado de um declínio com 12 horas o qual é restabelecido com 24 horas (**Figura 6B**), corroborando os dados de qPCR. Ao analisar se a ausência de NLRP3 poderia interferir no inflamassoma de NLRC4, não detectamos diferença na expressão de *Nlrc4* em BMDMs *Nlrp3*^{-/-} nos tempos iniciais da infecção. Entretanto, 24 horas após a infecção por *P. brasiliensis* houve uma expressão robusta de NLRC4 quando comparado ao WT (**Figura 6C**). Desta maneira, estes dados sugerem que NLRC4 exerce um papel regulador sobre a atividade do inflamassoma de NLRP3, uma vez que macrófagos *Nlrc4*^{-/-} apresentam elevada expressão de NLRP3 ao longo da infecção por *P. brasiliensis*.

Figura 6. A ativação inicial do inflamassoma de NLRC4 regula o inflamassoma de NLRP3 durante o estímulo com *P. brasiliensis*. (A) BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT), *Nlrp3*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram cultivados na presença ou não de leveduras viáveis de Pb18 (MOI 5) por 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Após os respectivos períodos de incubação o lisado celular foi coletado e a expressão do gene *Nlrp3* foi mensurada por PCR em tempo real. (B) Utilizando-se da mesma cinética de cultivo e infecção, a expressão genica de *Nlrp3* foi mensurada por PCR em tempo real nos BMDMs provenientes de animais WT e *Nlrp3*^{-/-}. (C) BMDMs de camundongos C57BL/6 e *Nlrp3*^{-/-} foram cultivados na presença ou ausência de *P. brasiliensis*, MOI 5. Após 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas, as células foram coletadas e subunidade p130 do NLRP3 foi detectada no lisado celular através da técnica de *western blotting*. Os resultados são representativos de dois experimentos. (*) $p < 0,05$ em relação aos respectivos genes endógenos, rt-PCR (β -2 microglobulina) e *Western blotting* (β -actina), juntamente com o controle não infectado.

4.4 O inflamassoma de NLRC4 modula a capacidade fungicida de macrófagos infectados *in vitro* por *P. brasiliensis*.

Para determinar se o inflamassoma de NLRC4 modularia a capacidade fungicida de macrófagos infectados por *P. brasiliensis*, infectamos BMDMs provenientes de animais WT e *Nlrc4*^{-/-} com 1 levedura viável do fungo para cada 25 células e analisamos a capacidade fungicida das mesmas. Macrófagos de animais deficientes de NLRC4 apresentaram uma maior atividade fungicida quando comparados ao grupo controle somente quando estas células *Nlrc4*^{-/-} não eram pré-tratadas com IFN- γ (**Figura 7A**), sugerindo que outros estímulos estejam potencializando a capacidade fungicida destes macrófagos.

Um dos fatores que medeiam à atividade fúngica de macrófagos é óxido nítrico (NO), importante radical livre envolvido no *killing* de leveduras (Nascimento *et al.*, 2002). A fim de avaliar se o inflamassoma de NLRC4 modularia a produção de NO durante a infecção *in vitro* por *P. brasiliensis*, quantificamos os níveis de NO no sobrenadante de cultura coletado durante o ensaio de atividade fungicida. De maneira equivalente à atividade fungicida, BMDMs de camundongos *Nlrc4*^{-/-} apresentaram maior produção de NO na ausência de IFN- γ (**Figura 7B**). Estes dados nos sugerem que a ausência de NLRC4 modula a produção do NO e, consequentemente a morte do fungo ocorre normalmente pelas células inflamatórias.

Figura 7. A atividade fungicida de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* é modulada pela ativação do inflamassoma de NLRC4. BMDMs de camundongo WT e *Nlrc4*^{-/-} ($2 \cdot 10^5$ células/poço) ativados ou não com IFN- γ (50ng/mL) foram co-cultivadas com leveduras viáveis do *P. brasiliensis* em uma relação fungo/M Φ (macrófago) de 1:25 em placa de cultura de 96 poços. **(A)** A atividade fungicida dos BMDM foi avaliada pela recuperação de unidades formadoras de colônia (CFU)/mL após 4 e 48 horas de co-cultivo. **(B)** A quantificação do NO foi mensurada no sobrenadante do cultivo de 48 horas da atividade fungicida através do método de Griess. (*) $p < 0,05$ em relação ao não infectado.

4.5 O inflamassoma de NLRC4 é responsável pela suscetibilidade do hospedeiro durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Com o intuito de investigar a importância do inflamassoma de NLRC4 durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*, camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} foram infectados por 1x10⁶ leveduras viáveis de Pb18. A contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) no pulmão, fígado e baço desses animais aos 7, 15 e 30 dias após infecção (dpi), mostra que, em relação ao WT, animais *Nlrc4*^{-/-} apresentaram menor quantidade de fungo no fígado aos 15 dpi, porém, no mesmo período testado, diferenças nos demais órgãos não foram encontradas. Além disso, nenhuma alteração na recuperação de leveduras viáveis foi observada no período inicial de infecção (7dpi) tanto no pulmão, como no fígado e baço (**Figura 8A**). Já aos 30 dpi, animais *Nlrc4*^{-/-} exibiram reduzidos números de fungo no pulmão, fígado e baço quando comparados aos animais WT (**Figura 8B**). Esses resultados foram confirmados *in situ*, quando marcamos, especificamente, o fungo através da coloração de *Grocott* (**Figura 8C**). Assim, estes dados indicam que a ausência de NLRC4 está associada ao controle do crescimento fúngico durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Figura 8. O inflamassoma de NLRC4 contribui para a suscetibilidade do hospedeiro contra o fungo *P. brasiliensis*. (A-B) A contagem de CFU foi determinada no pulmão, fígado e baço de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados com 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por 7, 15 e 30 dias. **(C)** Secções de 5µm de espessura obtidas do pulmão, fígado e baço de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados com 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* foram submetidas ao método de Grocott (impregnação da prata) e analisadas por microscopia de luz em 200µm, magnificação óptica de 200X. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, deficiente versus WT.

4.6 A ausência do inflamassoma de NLRC4 resulta na diminuição do processo fibrótico e na formação de granulomas bem definidos durante a infecção por *P. brasiliensis*.

O resultado da reação inflamatória desencadeada pela infecção por *P. brasiliensis* é a fibrose, processo que diminui a flexibilidade do tecido, acarretando em disfunção do órgão acometido (Franco *et al.*, 1998). A fibrose é causada por uma desorganização na matriz extracelular que leva a produção exacerbada de colágeno do tipo I, molécula de pouca flexibilidade e alta resistência, e de colágeno do tipo III, (conhecido também como fibras reticulínicas) que se entrelaçam para circundar a estrutura granulomatosa. Para avaliar se o inflamassoma de NLRC4 influenciaria no desenvolvimento de fibrose, secções de pulmão de animais C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-}, obtidas aos 30 dpi, foram coradas com picrosírius e analisadas em microscópio óptico. Camundongos *Nlrc4*^{-/-}, infectados por *P. brasiliensis*, produzem menos colágeno do que animais WT, devido à existência de áreas pulmonares amareladas e vermelhas, respectivamente (**Figura 9A**). Confirmando, os resultados da histologia, a quantificação das áreas de colágeno resultou em uma menor porcentagem de colágeno total em animais *Nlrc4*^{-/-} quando comparado ao grupo controle (**Figura 9B**).

Como a formação do granuloma é importante para restringir a expansão fúngica durante as fases crônicas da infecção por *P. brasiliensis*, a presença de uma resposta granulomatosa eficiente poderia ser a causa da eliminação do fungo. Com esse objetivo, analisamos a deposição de fibras reticulínicas (Col III) no tecido pulmonar de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} aos 30 dpi. Observamos que na ausência de NLRC4 estas fibras encontravam-se ao redor das extremidades das estruturas granulomatosas, ao passo que animais WT, possuíam maior quantidade de fibras reticulínicas distribuídas ao redor do granuloma (**Figura 9C**). Ademais, lâminas contendo secções de pulmão de animais C57BL/6 e *Nlrc4*^{-/-} infectados por 30 dias com *P. brasiliensis*, foram coradas com hematoxilina e eosina. Com base na observação histológica do tecido pulmonar constatamos que a ausência do receptor NLRC4 não impediu a formação de granulomas organizados e bem definidos. Adicionalmente, os espaços alveolares nestes animais não estavam preenchidos por infiltrado inflamatório como ocorreu nos animais C57BL/6 (**Figura 10A**).

A produção de TNF- α está associada com a formação de granulomas após o estímulo com frações antigênicas de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* (Diniz *et al.*, 2001). Afim de, validar a hipótese de que o desenvolvimento de granulomas compactos era uma consequência do aumento de TNF- α , mensuramos a síntese proteica desta citocina no homogenato pulmonar de animais WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados por 30 dias com Pb18. Nossos dados demonstram que não houve diferença na produção de TNF- α entre os dois grupos (**Figura 10B**), sugerindo que o inflamassoma de NLRC4 não interfere na produção de TNF- α durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*. Em resumo, estes dados indicam que o inflamassoma de NLRC4 durante a infecção por *P. brasiliensis*, aumenta o processo fibrótico, remodela as fibras reticulínicas, para impedir de maneira independente de TNF- α a formação de granulomas organizados e bem definidos, o que contribui para a proliferação do fungo.

4.7 O inflamassoma de NLRC4 regula a expressão de iNOS durante a infecção *in vivo* por *P. brasiliensis*.

O desenvolvimento do granuloma paracoccidióidico, reservatório quiescente de fungos está intimamente relacionado com a resposta imune do hospedeiro que impede a proliferação e a disseminação do agente invasor. A produção de radicais livres representa um dos principais mecanismos microbicidas contra diversos patógenos, sendo o óxido nítrico (NO) gerado pela ação enzimática da iNOS (Nishikaku *et al.*, 2009). Na tentativa de investigar se a resistência de animais *Nlrc4*^{-/-} estava relacionada com a maior expressão de iNOS, verificamos a presença desta enzima no tecido pulmonar de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} nos dias 7, 15 e 30 após a infecção. Os dados de imunohistoquímica demonstram que a enzima iNOS é induzida de maneira similar no pulmão de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} ao longo da infecção (**Figura 11**). Contudo, aos 7 (**Figura 11A-B**) e 15 (**Figura 11C-D**) dias após a infecção, a expressão de iNOS ocorreu em todo o tecido, ao passo que, em contrapartida, aos 30 dias a expressão de iNOS localizou-se, principalmente, dentro do granuloma de ambos os animais (**Figura 11E-F**). Estes resultados sugerem que a ausência do inflamassoma de NLRC4 não compromete a expressão da enzima iNOS no tecido pulmonar de animais infectados por *P. brasiliensis*.

Figura 9. A deficiência do inflamassoma de NLRC4 acarreta em diminuição do processo fibrótico. (A) Fragmentos de pulmão de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} foram obtidos aos 30 dias após a infecção intravenosa com 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18). Os lóbulos pulmonares foram fixados em formalina, incorporados em parafina e, posteriormente, corados por picrosírius para a análise da deposição de colágeno (aumento de 200x). **(B)** A deposição de colágeno foi quantificada através da área de coloração vermelha x área de tecido pulmonar. **(C)** Os lóbulos pulmonares de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-}, infectados por 30 dias com *P. brasiliensis*, foram fixados com formalina, parafinados e secções de 5µm foram coradas pela impregnação de prata (método de Gomori) para análise da presença e da organização de fibras reticulínicas (aumento de 200x). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais selvagens (C57BL/6).

Figura 10. A ausência do inflamassoma de NLRC4 não impede a formação de granulomas durante a infecção por *P. brasiliensis*. **(A)** Lóbulos pulmonares fixados em formalina, incorporados em parafina e corados com H&E foram utilizados para a obtenção de fotomicrografias (aumento de 200x) de lesões granulomatosas de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} aos 30 dias após a infecção intravenosa com 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*. **(B)** Dosagem de TNF- α no homogenato pulmonar de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, deficiente versus WT.

Figura 11. A ativação da *iNOS* no tecido pulmonar não é alterada pela ativação do inflamassoma de NLRC4 em camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Lóbulos pulmonares de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-}, infectados por *P. brasiliensis*, foram obtidos aos 7 (A e B), 15 (C e D) e 30 (E e F) dias. Cortes de 5µm de espessura, incubados com anticorpo específico para *iNOS*, foram contra-corados com hematoxilina e analisados por microscopia de luz. As fotos representam capturas feitas em aumento de 200X. Nota-se imunorreatividade positiva em marrom.

4.8 Os inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 são inversamente expressos durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Nosso próximo passo foi confirmar a regulação da expressão dos inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 *in vivo*. A princípio, determinamos a cinética de transcrição dos genes *Nlrc4* e *Nlrp3* no pulmão de animais WT infectados com 1×10^6 leveduras viáveis de Pb18 aos 7, 15, e 30 dpi. Nossos resultados demonstram que a expressão de *Nlrp3* aumentou em tempos iniciais (7dpi), porém declinou-se posteriormente. Ao contrario, a expressão de *Nlrc4* foi regulada positivamente somente com 30 dpi (**Figura 12A**). Questionamo-nos, se a ausência de NLRC4 poderia influenciar a expressão de *Nlrp3*. Observamos que houve um aumento na expressão de *Nlrp3* em animais *Nlrc4*^{-/-} quando comparado aos animais WT (**Figura 12B**). Em conjunto, nossos resultados sugerem que o inflamassoma de NLRC4 reprime a atividade de NLRP3, de maneira que na ausência de NLRC4 o inflamassoma de NLRP3 passa a ser expresso.

Figura 12. A expressão do inflamassoma de NLRP3 está aumentada em camundongos *Nlrc4*^{-/-} após a infecção *in vivo* por *P. brasiliensis*. (A) A expressão relativa do gene *Nlrc4* e *Nlrp3* foi determinada por PCR em tempo real aos 0, 7, 15 e 30 dias após a infecção no lóbulo pulmonar de camundongos C57BL/6. **(B)** Pulmões de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* foram coletados e processados para análise da expressão relativa de *Nlrp3* aos 0, 7, 15 e 30 dias após a infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. O símbolo (*) indica diferença estatística em relação ao grupo selvagem ($p < 0,05$).

4.9 O inflamassoma de NLRC4 regula a produção de IL-1 β e IL-18 ao longo da infecção por *P. brasiliensis*.

Macrófagos provenientes de camundongos resistentes à infecção por *P. brasiliensis* (A/J) expressam níveis elevados de transcritos para *Nlrp3*, *Asc* e *IL-1 β* , bem como apresentam atividade significativa de caspase-1 quando comparados com células derivadas de animais suscetíveis (B10.A) (Feriotti *et al.*, 2015). Conforme demonstrado na **Figura 12B**, camundongos deficientes para NLRC4 apresentam um aumento na expressão de *Nlrp3* nos dias 7 e 30 após a infecção. Considerando que a ativação do inflamassoma de NLRP3 leva a secreção de IL-1 β e IL-18 mensuramos a quantidade dessas citocinas no homogenato pulmonar obtido de animais WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados com 1x10⁶ leveduras viáveis de Pb18. Em momentos iniciais da infecção, observamos que animais *Nlrc4*^{-/-} apresentam um aumento na produção de IL-1 β quando comparado aos animais WT (**Figura 13A**). Entretanto, quando avaliamos a produção de IL-18 observamos um perfil oposto ao da IL-1 β : animais *Nlrc4*^{-/-} produzem menos IL-18 do que o grupo controle (**Figura 13B**). Como IL-1 β é a molécula efetora da via do inflamassoma, analisamos a expressão desta citocina no tecido pulmonar dos animais infectados por *P. brasiliensis*. Confirmando os dados da **Figura 13A**, podemos observar que, no período de 7dpi, animais *Nlrc4*^{-/-} possuem uma maior expressão de IL-1 β do que animais do grupo selvagem (**Figura 13C**). Curiosamente, quando avaliamos estas mesmas citocinas 30 dias após a infecção, observamos uma alteração no perfil de produção. Comparado aos animais WT, animais *Nlrc4*^{-/-} apresentaram uma redução na produção de IL-1 β (**Figura 13D**) e um aumento na produção de IL-18 (**Figura 13E**). Portanto, estes dados nos permitem concluir que, durante a infecção por *P. brasiliensis*, a produção de IL-1 β e IL-18 ocorre de maneira antagônica em animais *Nlrc4*^{-/-}.

Figura 13. A produção de IL-1 β e IL-18 são reguladas pelo inflamassoma de NLRC4. (A, B, D e E) Animais WT e *Nlrc4*^{-/-} foram infectados intravenosamente com 1×10^6 leveduras viáveis de Pb18. Os pulmões foram coletados aos 7 e 30 dias após a infecção. A dosagem dos níveis pulmonares de IL-1 β e IL-18 foi mensurada por ELISA. **(C)** A expressão de IL-1 β em secções pulmonares (5 μ m) foi avaliada, em animais WT e *Nlrc4*^{-/-}, por imunohistoquímica (aumento de 400x) no dia 7 após a infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, deficiente *versus* WT.

4.10 O inflamassoma de NLRC4 não influencia no perfil Th17 de resposta durante a infecção por *P. brasiliensis*.

É sabido que a presença de IL-6 e TGF- β é necessária para a diferenciação de células T virgens em células Th17 produtoras de IL-17, e que a IL-1 β potencializa esse processo (Veldhoen and Stockinger, 2006; Bettelli *et al.*, 2007). Como animais *Nlrc4*^{-/-} apresentaram um aumento na produção de IL-1 β nos momentos iniciais da infecção, investigamos se o maior número de células Th17 seria a explicação para a resistência observada nesses animais. Neste contexto, dosamos IL-6 e IL-17 no pulmão de animais WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados com 1x10⁶ formas viáveis de leveduras de *P. brasiliensis* nos dias 7, 15 e 30 após a infecção. Nenhuma diferença foi encontrada na produção de IL-6 entre animais WT e *Nlrc4*^{-/-} durante os três períodos analisados (**Figura 14A**). Porém, aos 7 dias de infecção, observou-se uma menor produção de IL-17 pulmonar em animais *Nlrc4*^{-/-} quando comparado aos animais WT. Não foi observado diferença na produção de IL-17 entre animais WT e *Nlrc4*^{-/-} nos outros períodos avaliados (**Figura 14B**). Corroborando estes dados, não observamos mudanças na porcentagem e no número absoluto de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 em animais *Nlrc4*^{-/-} quando comparados aos WT (**Figura 14 C**). Desta forma, estes dados sugerem que a ativação do inflamassoma de NLRC4 não interfere no perfil Th17 de resposta durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

4.11 Os níveis de CXCL-1 e CXCL-2 não são alterados na ausência do inflamassoma de NLRC4 durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Conforme demonstrado na **Figura 14**, não há diferença na resposta Th17 entre animais WT e *Nlrc4*^{-/-}. Com o propósito de investigar a relação entre as células Th17 e o recrutamento de neutrófilos, mensuramos a quantidade de CXCL1 e CXCL2 no homogenato pulmonar de camundongos *Nlrc4*^{-/-} e WT infectados por 30 dias com leveduras viáveis de Pb18. Não houve diferença na produção de CXCL-1 (KC) (**Figura 15A**) e CXCL-2 (MIP-2) (**Figura 15B**) entre os animais WT e *Nlrc4*^{-/-} aos 30 dpi. Assim, estes resultados indicam que a ausência do inflamassoma de NLRC4

não altera a produção de quimiocinas importantes para o recrutamento de neutrófilos durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Figura 14. A defesa antifúngica, que ocorre na ausência do inflamassoma de NLRC4, não depende do perfil de resposta Th17. (A) Os níveis de IL-6 e **(B)** IL-17 no homogenato pulmonar obtido de camundongos WT e *Nlr4*^{-/-} foram quantificados por ELISA aos 0, 7, 15 e 30 dias após o desafio com o fungo. **(C)** Leucócitos isolados do pulmão de camundongos C57BL/6 e *Nlr4*^{-/-} foram marcados com anticorpo anti-CD3, anti-CD4 e anti-IL-17A e analisados por citometria de fluxo. A porcentagem e o número absoluto de células TCD4⁺ produtoras de IL-17A presente no pulmão de animais WT (barra branca) e *Nlr4*^{-/-} (barra preta) aos 30 dias após a infecção foram plotados no gráfico de barras. Cada barra representa a média $\pm$ o desvio padrão do parâmetro em questão. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. O símbolo (*) indica diferença significativa comprada com o grupo WT ($p < 0,05$).

Figura 15. O inflamassoma de NLRC4 não altera a produção de quimiocinas que auxiliam no recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *P. brasiliensis*. Camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} foram infectados intravenosamente por 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* e os pulmões coletados após 30 dias de infecção. A dosagem de **(A)** CXCL-1 (KC) e **(B)** CXCL-2 (MIP-2) foram realizadas no homogenato pulmonar por ELISA. Cada barra representa a média $\pm$ o desvio padrão do parâmetro em questão. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. O símbolo (*) indica diferença significativa comprada com o grupo WT ($p < 0,05$).

4.12 A ausência do inflamassoma de NLRC4 modula a produção de citocinas do perfil Th1 durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

A eficiência da resposta imune durante a PCM está relacionada com o perfil de resposta imune desencadeado. A polarização para o perfil de resposta Th1, o qual envolve a produção de citocinas IL-12, IL-18 e IFN- γ , está relacionada com o prognóstico positivo da doença (Calich e Kashino, 1998). Nesse contexto, avaliamos, subsequentemente, se o inflamassoma de NLRC4 modularia a resposta Th1. Inicialmente, quantificamos, após 30 dias de infecção, os níveis de IL-12p40 no pulmão de camundongos *Nlrc4*^{-/-} e C57BL/6. Conforme hipotetizado, um aumento da produção de IL-12p40 foi observado em camundongos *Nlrc4*^{-/-} quando comparado aos WT (**Figura 16A**). Como demonstrado na **Figura 13E**, aos 30 dpi, animais *Nlrc4*^{-/-} apresentam um aumento na produção de IL-18. Sabe-se que a IL-18, assim como a IL-12, é uma importante indutora de IFN- γ em células TCD4⁺ (Lebel-Binay *et al.*, 2000). Por isso, em seguida, avaliamos a produção de IFN- γ no homogenato pulmonar de camundongos *Nlrc4*^{-/-} e WT infectados por 30 dias com *P. brasiliensis*. Nossos resultados revelam que, em relação ao WT, animais deficientes de NLRC4

tiveram um aumento na produção de IFN- γ (**Figura 16B**). Ademais, ao quantificar, nestas mesmas amostras, os níveis de IL-10, observamos que animais WT produzem uma quantidade maior de IL-10 do que animais *Nlr4*^{-/-} (**Figura 16C**). Em conjunto, nossos dados demonstram que o inflamassoma de NLRC4 modula a produção de citocinas do perfil Th1 protetor durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Figura 16. A ativação do inflamassoma de NLRC4 pelo fungo *P. brasiliensis* prejudica a síntese de citocinas envolvidas com a resposta do tipo Th1. Camundongos WT e *Nlr4*^{-/-} foram infectados intravenosamente com 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Os pulmões foram coletados após 30 dias e a dosagem de (A) IL-12p40, (B) IFN- γ e (C) IL-10 foram realizadas no homogenato pulmonar por ELISA. Cada barra representa a média $\pm$ o desvio padrão do parâmetro em questão. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. (*) ($p < 0,05$), deficiente versus C57BL/6.

4.13 Camundongos deficientes para NLRC4 apresentam um aumento nas células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

As células T efetoras são classificadas em linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th) e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Murphy, 2010). Esses dois tipos celulares exercem um papel importante durante a PCM experimental: enquanto as células T CD8⁺ controlam a carga fúngica, a produção de citocinas é regulada pelas células T CD4⁺ (Chiarella *et al.*, 2007). Para fenotipar essas sub-populações celulares, o tecido pulmonar de animais WT e *Nlr4*^{-/-} infectados com 1×10^6 leveduras de Pb18 viáveis

foi avaliado por citometria de fluxo após 30 dpi. Na **Figura 17A**, observa-se que, em animais WT, a infecção aumentou o número absoluto (**Figura 17B**) e a frequência (**Figura 17C**) de células T CD3⁺CD4⁺ em animais WT, mas diminuiu o número absoluto (**Figura 17D**) e a frequência (**Figura 17E**) de células T CD3⁺CD8⁺. Em contraste, essa redução na população de células T CD3⁺CD8⁺ não foi detectada quando animais *Nlrc4*^{-/-} infectados foram comparados aos não infectados (**Figura 17D e 17E**).

Como as células T CD4⁺ são as principais células responsáveis pela produção de IFN- γ , nos questionamos se a produção desta citocina seria oriunda de células TCD3⁺CD4⁺. Não verificamos diferenças na porcentagem nem no número absoluto de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ quando os animais *Nlrc4*^{-/-} foram comparados ao grupo controle (**Figura 17F**). Surpreendentemente, o mesmo não ocorreu quando examinamos as células T CD8⁺IFN γ ⁺. Ou seja, nossos resultados evidenciaram um aumento na porcentagem e número absoluto de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ em camundongos *Nlrc4*^{-/-} (**Figura 17G**). Desta forma, concluímos que a ativação do inflamassoma de NLCR4 por *P. brasiliensis* diminui os linfócitos T CD8⁺ importantes para a produção de IFN- γ .

Figura 17. A resistência de animais *Nlrc4*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* requer a produção de IFN-γ por linfócitos T CD8⁺. (A-G) Leucócitos isolados do pulmão de camundongos WT e *Nlrc4*^{-/-} infectados durante 30 dias com *P. brasiliensis* marcados com anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-IFNγ foram analisados por citometria de fluxo. A porcentagem e o número absoluto das células fenotipadas foram representados por gráficos de barras. Cada barra representa a média ± o desvio padrão do parâmetro em questão. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. O símbolo (*) indica diferença significativa comparada com o grupo WT (p < 0,05).

5. Discussão

Infecções causadas por microrganismos desencadeiam respostas inflamatórias que promovem a eliminação do patógeno e reparo tecidual. Desta maneira a resposta inflamatória contra um determinado patógeno é decorrente da ativação do sistema imunológico que é subdividido de maneira distinta, porém interdependentes entre si: o sistema imune inato e o adaptativo. O sistema imune inato exerce um papel importante durante o processo inflamatório agudo, pois é responsável pela detecção inicial de uma gama de patógenos, além de detectar anormalidades endógenas. Uma das características do sistema imune adaptativo é a geração de memória mediada por linfócitos, que possuem receptores que são submetidos a uma grande variedade de rearranjos gênicos e são capazes de gerar diversos clones após uma exposição inicial ao patógeno (Abbas, 2012).

Devido aos seus papéis distintos, a relação entre o sistema imune inato e adaptativo foi um grande paradigma durante anos. A descoberta de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) foi a chave fundamental para entender a relação entre a ativação do sistema imune inato *versus* sistema imune adaptativo. Sendo assim, resposta imune inicia-se pelo reconhecimento de estruturas conservadas pertencentes ao patógeno por intermédio dos PRR que leva à ativação de cascatas de sinalização intracelulares, culminando diferentes tipos de resposta inflamatória (Iwasaki and Medzhitov, 2015).

Receptores do tipo Toll foram os primeiros PRR a serem descritos. Desde então diversos estudos buscaram entender melhor a relação destes receptores localizados na membrana plasmática e no endossomos das células do sistema imune inato. Todavia, o reconhecimento e resposta do hospedeiro a uma variedade de microrganismos não é restrita apenas aos receptores do tipo TLR. Com o avanço dos estudos, novos receptores foram descritos e associados a este reconhecimento, como os receptores intracelulares da família NLR, que atuam de maneira similar aos TLR (Inohara and Nunez, 2003; Martinon and Tschopp, 2005). Esta similaridade está relacionada ao fato de que ambos os receptores TLR e NLR reconhecem o patógenos através de uma estrutura semelhante, o domínio LRR. Entretanto eles exercem um papel diferente na indução da cascata de sinalização para síntese de citocinas.

Uma variedade de receptores NLR tem sido associada ao reconhecimento de diversos patógenos intra e extracelulares, incluindo fungos (Tavares *et al.*, 2015).

Estes receptores também são caracterizados por formarem um complexo multiproteico denominado inflamassoma, que por sua vez é responsável pela clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas biologicamente ativas (Inohara and Nunez, 2003; Tavares *et al.*, 2015). Nosso grupo demonstrou que o inflamassoma de NLRP3 está associado à resistência durante a infecção por *P. brasiliensis*, e que o efeito protetor do inflamassoma de NLRP3 depende da robusta ativação de caspase-1. Uma vez ativada, caspase-1 desencadeia uma resposta pró-inflamatória dependente de IL-18, a qual é responsável pelo perfil de resistência à infecção. Intrigantemente, a quantidade de IL-1 β não é reduzida totalmente em camundongos *Nlrp3*^{-/-} infectados, o que sugere o envolvimento de outros receptores de reconhecimento padrão adicionais na resposta imune frente a este patógeno (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). Neste sentido, buscamos entender o envolvimento do inflamassoma de NLRC4 durante a PCM experimental.

Nossos dados mostram que BMDMs de camundongos selvagens (WT) infectados com o *P. brasiliensis* são capazes de expressar inflamassoma de NLRC4 e NLRP3, induzindo a expressão de IL-1 β e IL-18 (**Figura 4**). Recentemente, estudos relataram a ativação do inflamassoma de NLRP3 por diversos fungos como: *Candida albicans* (Pietrella *et al.*, 2013), *Aspergillus fumigatus* (Said-Sadier *et al.*, 2010), *Cryptococcus neoformans* (Lei *et al.*, 2013), e o *P. brasiliensis* (Tavares *et al.*, 2013; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). Porém quando pensamos no inflamassoma de NLRC4, logo imaginamos o reconhecimento de flagelina bacteriana (Kofoed and Vance, 2011; Lightfield *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Todavia, alguns trabalhos evidenciaram a ativação do inflamassoma de NLRC4 por bactérias não flageladas (Sutterwala *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011), e estímulos estéreis indutores de dor (Lenart *et al.*, 2016). No entanto, a relação entre este inflamassoma NLRC4 e o reconhecimento fúngico ainda foi pouco estudada. Em conjunto, os nossos achados demonstram pela primeira vez que *P. brasiliensis* é capaz de ativar o inflamassoma de NLRC4. Desta maneira, utilizamos animais *Nlrc4*^{-/-} para avaliar o envolvimento do inflamassoma de NLRC4 durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*.

A ativação do inflamassoma de NLRC4 esta diretamente relacionada com a produção de IL-1 β durante infecções causadas por *Salmonella* (Franchi *et al.*, 2012). Curiosamente, nossos achados evidenciam que a ausência de NLRC4 em BMDM

infectados com *P. brasiliensis* leva ao aumento na síntese protéica de IL-1 β de maneira independente da ativação de caspase-1 (**Figura 5**). Alguns estudos têm evidenciado a ação da captepsina C (Kono *et al.*, 2012) e da elastase de neutrófilos (Karmakar *et al.*, 2012) durante o processo de maturação da IL-1 β independente de inflamassoma. Entretanto, foi demonstrado que a caspase-8 em conjunto com o inflamassoma de Nlrp3 auxilia a maturação de IL-1 β durante a infecção causada por *Candida albicans* (Ganesan *et al.*, 2014), e que células dendríticas infectadas com *C. neoformans* ativam o inflamassoma por desviarem para a via de caspase-8 quando caspase-1 está ausente, uma vez que é demonstrado que a caspase-1 suprime a ativação da via não canônica de caspase-8 (Chen *et al.*, 2015). Diante disso, especulamos que o aumento da IL-1 β possa ocorrer devido à ação de outras proteases.

A interação do patógeno com os receptores NLR desencadeia sua ativação. Inicialmente foi documentando que a infecção causada por *Salmonella typhimurium* leva a ativação mútua dos inflamassomas de NLRC4 e NLRP3 formando um único complexo macromolecular dentro da célula (Man *et al.*, 2014). Yan Qu e colaboradores comprovaram que esta ativação não acontece de maneira simultânea, mas que em momento iniciais da infecção por *S. typhimurium* ocorre à ativação do inflamassoma de NLRC4 e posterior recrutamento do inflamassoma de NLRP3 (Qu *et al.*, 2016). Nossos dados demonstram claramente que os níveis de expressão gênica de *Nlrp3* são regulados pelo inflamassoma de NLRC4, uma vez que foi verificado que durante a ausência de NLRC4 há um aumento na expressão do gene *Nlrp3*, e o inverso pode ser averiguado em BMDM provenientes de animais deficientes para inflamassoma de NLRP3.

Estudos recentes evidenciam o papel de mediadores lipídicos na inibição e ativação de inflamassomas. Macrófagos derivados da medula óssea tratados com doses crescentes de PGE2 apresentam uma diminuição proporcional na produção de IL-1 β , corroborando a ideia de que este mediador afeta a clivagem de caspase-1 e IL-1 β em sua forma madura (Mortimer *et al.*, 2016). Curiosamente, humanos e animais quando entram em contato com o veneno de escorpião desencadeiam um grave edema pulmonar, o qual está associado com ativação do inflamassoma de NLRP3 que resulta na produção de IL-1 β e surpreendentemente de PGE2 e LTB4 (Zoccal *et al.*, 2016) Entretanto, não só o inflamassoma de NLRP3 tem sido

associado à ação de mediadores lipídicos, de maneira oposta BMDM pré-tratados com indometacina (inibidor seletivo de COX), e estimulados com *Anaplasma phagocytophilum* apresentam uma diminuição na oligomerização de NLRC4, evidenciando que a sinalização via o eixo PGE2/EP3 modula a ativação do inflamassoma de NLRC4 (Wang *et al.*, 2016). Desta forma, nossos dados sugerem que o inflamassoma de NLRC4 poderia antagonizar o inflamassoma de NLRP3, e que a ação de mediadores lipídicos não pode ser descartada neste modelo, uma vez que, o nosso grupo já evidenciou que animais deficientes para 5-lipoxigenase (5-LO) são resistentes à infecção por *P. brasiliensis* (Tristao *et al.*, 2013).

As evidências apresentadas aqui apoiam a hipótese de que o *P. brasiliensis* é capaz de ativar o inflamassoma de NLRC4 e este impossibilita a ativação do inflamassoma de NLRP3 (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). O controle e a morte de diversos patógenos está relacionado a uma boa atividade microbicida exercida principalmente por macrófagos, os quais sintetizam produtos tóxicos que atuam no processo fungicida (Ding *et al.*, 1988). O óxido nítrico é um reativo intermediário de nitrogênio produzido por iNOS (óxido nítrico sintase indutível) (Bogdan, 2001), e representa uma das principais moléculas utilizadas durante processos microbicidas contra uma variedade de patógenos. Estes incluem *Schistosoma mansoni* (James and Glaven, 1989), *Leishmania major* (Liew *et al.*, 1990), *Histoplasma capsulatum* (Lane *et al.*, 1994), e *Mycobacterium tuberculosis* (Macmicking *et al.*, 1997).

A resistência ao fungo durante a PCM é dependente da atividade de células mediadas por IFN- γ e TNF- α . A atividade microbicida durante a infecção com *P. brasiliensis* é associada ao efeito sinérgico destas duas citocinas (Souto *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2001). Existem relatos de que o IFN- γ potencializa macrófagos a produzirem óxido nítrico e promovem a morte de leveduras de *P. brasiliensis* (Nishikaku *et al.*, 2009). De forma, surpreendente, a ausência do inflamassoma de NLRC4 promove uma atividade fungicida eficaz, assim como produção de óxido nítrico de maneira independente de estímulos de IFN- γ (**Figura 7**). Outras citocinas são capazes de potencializar o efeito das células fagocíticas. Quando estimulados com IL-1 β e infectados com leveduras de *P. brasiliensis*, células polimorfonucleares (PMNs) de doadores saudáveis exercem atividade fungicida mais robusta (Kurita *et al.*, 2000). Estes fatos sugerem que a ativação celular de BMDM *Nlrc4*^{-/-} possa ocorrer pela ação IL-1 β de maneira independente de IFN- γ , uma vez que BMDM

Nlrc4^{-/-} apresentam um aumento significativo na produção desta citocina (**Figura 5**). Estes dados foram corroborados com análises *in vivo*, nas quais não evidenciamos alteração na enzima iNOS no pulmão durante todo o percurso da infecção, apesar do aumento IFN- γ no homogenato pulmonar dos animais *Nlrc4*^{-/-}.

Além disso, nossos dados demonstram que o inflamassoma de NLRC4 exerce um importante papel na susceptibilidade durante a infecção experimental com *P. brasiliensis* *in vivo* (**Figura 8**). De fato, nosso trabalho descreve um mecanismo oposto do papel do inflamassoma de NLRC4 em infecções por fungos. Durante a infecção por *Candida albicans*, o inflamassoma de NLRC4 é ativado e confere resistência por intermédio do controle da migração de células inflamatória para a mucosa (Tomalka *et al.*, 2011).

Corroborando com os dados obtidos sobre a redução da carga fúngica, a análise histopatológica de pulmão de animais *Nlrc4*^{-/-} infectado por *P. brasiliensis* evidenciou a presença de granulomas menores, mais compactos, e com limites bem definidos. Os granulomas são formados como consequência da persistência antigênica e a interação entre o organismo infeccioso e as células imunológicas do hospedeiro (Regev *et al.*, 2012). Alguns elementos auxiliam na formação do granuloma, por exemplo, durante a infecção por *Mycobacterium abscessus* a formação do granuloma é estritamente dependente da produção de TNF- α e auxílio de IL-8 (Bernut *et al.*, 2016). De maneira oposta, não encontramos diferença na produção de TNF- α nos animais deficientes *Nlrc4*^{-/-} quando comparados aos controles (**Figura 8**). Acreditamos que independente de TNF- α , a boa formação do granuloma em animais *Nlrc4*^{-/-} esteja associada à redução do processo fibrotico e deposição de fibras reticulínicas (colágeno do tipo III) no pulmão (**Figura 9**).

A resposta fibrogênica está relacionada com a elaboração da matriz extracelular e sua deposição dinâmica no tecido. Este processo gera cicatrizes fibróticas que são predominantemente compostas de colágenos intersticiais (tipo I e III) (Rockey *et al.*, 2015). Durante a infecção por *P. brasiliensis* o recrutamento de leucócitos responsáveis pela formação do granuloma induzem fibrose (Franco *et al.*, 1998). Paradoxalmente, a IL-1 β tem sido relacionada com a proliferação de fibroblastos durante o processo de fibrose (Elias *et al.*, 1990; Kovacs, 1991). A ativação do inflamassoma de Nlrp3 e produção de IL-1 β por intermédio do estímulo com antígenos do ovo de *Schistosoma* induz uma resposta inflamatória que medeia

à fibrose no fígado (Meng *et al.*, 2016). O nosso trabalho, no entanto, é o primeiro a relacionar a importância do inflamassoma de NLRC4 e a formação de granuloma.

Nossos dados indicam que o inflamassoma de NLRC4 regula o equilíbrio na produção de IL-1 β e IL-18 durante a PCM (**Figura 13**). A sinalização por IL-1 β tem um papel fundamental no controle de doenças parasitárias, incluindo: leishmanioses (Lima-Junior *et al.*, 2013) e doença de chagas (Silva *et al.*, 2013); assim como fúngicas como: Aspergilose (Said-Sadier *et al.*, 2010) e Candidíase (Hise *et al.*, 2009). Da mesma forma, a IL-18 exerce um papel protetor durante a infecção experimental por *P. brasiliensis* (Panagio *et al.*, 2008).

Posteriormente a estimulação dos PRRs as células do sistema imune inato produzem citocinas que amplificam as respostas imunes adaptativas. A IL-1 β , IL-6 e IL-23 são de extrema importância durante o processo de diferenciação de células Th17 (Veldhoen and Stockinger, 2006; Bettelli *et al.*, 2007). Após sua descrição, as células Th17 têm sido associadas à gravidade de doenças auto-imunes e inflamatórias tais como: artrite reumatóide e esclerose múltipla (Kurasawa *et al.*, 2000; Nakae *et al.*, 2003). Além disso, elas exercem um papel protetor durante as infecções causadas por protozoários como: *Trypanosoma cruzi* (Da Matta Guedes *et al.*, 2010) e *Leishmania infantum* (Nascimento *et al.*, 2015). Estas células também estão relacionadas com desempenho da resposta imune durante infecções causadas por fungos (Romani, 2004). Ao contrario das infecções causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, onde a ativação das células Th17 controlam a infecção (Zelante *et al.*, 2007), verificamos que a deficiência de *Nlrc4*^{-/-} não influencia a diferenciação de células Th17 produtoras de IL-17A durante a infecção por *P. brasiliensis* (**Figura 14**). Ainda, observamos que os níveis de CXCL-1 e CXCL-2 não foram alterados entre animais WT e *Nlrc4*^{-/-} após 30 dias de infecção (**Figura 15**). Estas quimiocinas podem ser produzidas/induzidas por células Th17 no sítio inflamatório, e orquestram o recrutamento de neutrófilos dos vasos sanguíneos para o local da infecção (Jose *et al.*, 1991; Ley, 2002). Estes dados sugerem que a resposta de células Th17 não é necessária para o perfil de resistência observado em camundongos *Nlrc4*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*.

O propósito da resposta imune durante a infecção fúngica é a eliminação do fungo e o controle dos danos colaterais da inflamação para o restabelecimento da homeostase (Romani, 2004). Células T reguladoras previnem respostas

inflamatórias exacerbadas a antígenos próprios e estranhos na periferia, suprimindo células T efectoras por intermédio da produção de IL-10 (Toda and Piccirillo, 2006). Pacientes com formas graves de candidíase e aspergilose apresentam níveis elevados de IL-10 no soro. Esta citocina afeta negativamente a produção de IFN- γ , o que sugere uma relação inversa entre a produção destas citocinas durante as infecções fúngicas (Romani and Puccetti, 2006) Corroborando com esta idéia, De Costa e colaboradores evidenciaram que camundongos deficientes de IL-10 apresentam um perfil de resistência durante a infecção com *P. brasiliensis* (Da Costa *et al.*, 2015).

Durante a PCM em paciente e modelos experimentais, a forma exacerbada e disseminada da doença esta associada com a incapacidade de diferenciação de células para um perfil Th1 (Ramos and Saraiva Ldo, 2008). A diferenciação de linfócitos Th1 é regulada pelo fator de transcrição T-bet, e estas células produzem citocinas como IL-2, IL-18, e IFN- γ (Szabo *et al.*, 2000).Extrapolando para o nosso modelo de estudo, associamos a resistência dos animais *Nlrc4*^{-/-} com o aumento da produção de IL-18 (**Figura 13**) IL-12p40 e IFN- γ , assim como redução dos níveis de IL-10 aos 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis* (**Figura 16**).

O IFN- γ é uma citocina chave para a defesa do hospedeiro durante infecções causadas por patógenos intracelulares. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são as principais fontes desta citocina. Entretanto, células T CD4⁺ possuem maior capacidade de secreção de IFN- γ quando comparada as células T CD8⁺ durante a infecção por *Mycobacterium bovis* (Ngai *et al.*, 2007). Durante a infecção por *P. brasiliensis*, as funções das células T CD4⁺ e T CD8⁺ são bem estabelecidas. A produção de anticorpos e citocinas são atribuídas às células T CD4⁺, enquanto que o controle da carga fúngica é mediado pelas células T CD8⁺ (Chiarella *et al.*, 2007).

Durante a infecção por *P. brasiliensis*, camundongos deficientes para o gene NLRC4 apresentam um aumento na população de linfócitos TCD8⁺ quando comparado ao animal controle não infectado (**Figura 17**), concluindo que a infecção induz o aumento da população de células TCD8⁺. Recentemente, Novais e colaboradores evidenciaram que durante a infecção por *Leishmania brasiliensis* (causadora da forma cutânea da doença) células TCD8 citotóxicas são capazes de modular a ativação do inflamassoma devido à liberação de granzinas e perforinas que interagem com as células infectadas, como consequência o stress celular e a

liberação de danos são capazes de ativar o inflamassoma de NLRP3 (Novais *et al.*, 2017).

Intrigantemente, observamos que durante a infecção por *P. brasiliensis*, a ausência de NLRC4 leva ao aumento da população de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (**Figura 17**). Em concordância com os nossos dados, indivíduos com a forma aguda da PCM apresentam um aumento na frequência de células com granzima A, B e perforina positiva quando comparados aos indivíduos com a forma crônica, e sugere que as células T CD8⁺ participam diretamente na eliminação do fungo no local da infecção (Burlandy-Soares *et al.*, 2010). Deste modo podemos inferir que o inflamassoma de Nlrc4 modula a diferenciação de padrões celulares e produção de citocinas, os quais influenciam a suscetibilidade do hospedeiro durante a paracoccidiodomicose experimental.

6. Conclusão

Com base nos dados apresentados aqui, concluímos que a ativação do inflamassoma de NLRC4 confere suscetibilidade a infecção por *P. brasiliensis* em camundongos.

7. Referências

- ABBAS, A. K. L., A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular** Elsevier: 2012.
- ABREU E SILVA, M. A. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis--a literature review. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 189-99, May 2013.
- ACORCI-VALERIO, M. J. et al. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J Immunol**, v. 71, n. 2, p. 99-108, Feb 2010.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 24 2006.
- AMER, A. et al. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. **J Biol Chem**, v. 281, n. 46, p. 35217-23, Nov 17 2006.
- ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 25-32, Feb 2004.
- AVERETTE, K. M. et al. Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7913, Nov 18 2009.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, Apr-May 2008.
- BENARD, G. et al. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 54, n. 1, p. 7-12, Jan 1996.
- BENARD, G. et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J Infect Dis**, v. 175, n. 5, p. 1263-7, May 1997.
- BERNUT, A. et al. Mycobacterium abscessus-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 11, p. e1005986, Nov 2016.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 652-7, Dec 2007.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 907-16, Oct 2001.
- BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 722-33, Nov 2009.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993.

- BRYAN, N. B. et al. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. **J Immunol**, v. 182, n. 5, p. 3173-82, Mar 01 2009.
- BUITRAGO, M. J. et al. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. **J Travel Med**, v. 18, n. 1, p. 26-33, Jan-Feb 2011.
- BURCKSTUMMER, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nat Immunol**, v. 10, n. 3, p. 266-72, Mar 2009.
- BURLANDY-SOARES, L. C. et al. Expression of activation and cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes of patients with paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 48, n. 6, p. 843-52, Sep 2010.
- CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p. 175-7, Feb 28 1979.
- CAMPANELLI, A. P. et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1496-505, May 1 2003.
- CANO, L. E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 800-6, Feb 1998.
- CASE, C. L.; SHIN, S.; ROY, C. R. Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to Legionella pneumophila. **Infect Immun**, v. 77, n. 5, p. 1981-91, May 2009.
- CHAVARRIA-SMITH, J.; VANCE, R. E. Direct proteolytic cleavage of NLRP1B is necessary and sufficient for inflammasome activation by anthrax lethal factor. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 6, p. e1003452, 2013.
- CHEN, G. et al. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 365-98, 2009.
- CHEN, M. et al. Internalized Cryptococcus neoformans Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. **J Immunol**, v. 195, n. 10, p. 4962-72, Nov 15 2015.
- CHIARELLA, A. P. et al. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 9, p. 1078-88, Jul 2007.
- COCK, A. M. et al. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 42, n. 2, p. 59-66, Mar-Apr 2000.

- COIMBRA JUNIOR, C. E. et al. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupi-Monde Amerindian populations from Brazilian Amazonia. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 88, n. 2, p. 197-207, Apr 1994.
- COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sep-Oct 2002.
- DA COSTA, T. A. et al. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice treated with modulated dendritic cells relies on inhibition of interleukin-10 production by CD8+ T cells. **Immunology**, v. 146, n. 3, p. 486-95, Nov 2015.
- DA MATTA GUEDES, P. M. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, Feb 16 2010.
- DE CASTRO, L. F. et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect**, v. 67, n. 5, p. 470-85, Nov 2013.
- DEFAVERI, J.; MARTIN, L. C.; FRANCO, M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. **Mycopathologia**, v. 105, n. 1, p. 53-8, Jan 1989.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, v. 141, n. 7, p. 2407-12, Oct 01 1988.
- DINIZ, S. N. et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Hum Immunol**, v. 62, n. 8, p. 799-808, Aug 2001.
- DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674-7, May 02 2008.
- ELIAS, J. A. et al. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. **Chest**, v. 97, n. 6, p. 1439-45, Jun 1990.
- FAVA, S. D. C.; NETTO, C. F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 155-64, May-Jun 1998.
- FELDMANN, J. et al. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 1, p. 198-203, Jul 2002.
- FERIOTTI, C. et al. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 6, p. 913, 2015.

- FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1590-604, Sep 2007.
- FIGUEIREDO, F.; ALVES, L. M.; SILVA, C. L. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin Exp Immunol**, v. 93, n. 2, p. 189-94, Aug 1993.
- FORTES, M. R. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 516-24, May-Jun 2011.
- FRANCHI, L. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 576-82, Jun 2006.
- FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat Immunol**, v. 10, n. 3, p. 241-7, Mar 2009.
- FRANCHI, L. et al. NLRC4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. **Nat Immunol**, v. 13, n. 5, p. 449-56, May 2012.
- FRANCO, L. et al. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 424-30, Apr 1998.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, Feb 1987.
- FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, Apr-Jun 1987.
- GANESAN, S. et al. Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1beta production in response to beta-glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 193, n. 5, p. 2519-30, Sep 01 2014.
- GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-18, Dec 12 2013.
- GEDDES, B. J. et al. Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 284, n. 1, p. 77-82, Jun 1 2001.
- GEDDES, K.; MAGALHAES, J. G.; GIRARDIN, S. E. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 6, p. 465-79, Jun 2009.

- GONZALEZ, A. et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2546-52, May 2000.
- GU, Y. et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 206-9, Jan 10 1997.
- HE, Y.; HARA, H.; NUNEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, Dec 2016.
- HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasomes: far beyond inflammation. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 321-4, Mar 19 2012.
- HISE, A. G. et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 5, p. 487-97, May 08 2009.
- HOFFMAN, H. M. et al. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nat Genet**, v. 29, n. 3, p. 301-5, Nov 2001.
- HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514-8, Mar 26 2009.
- INOHARA et al. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p. 355-83, 2005.
- INOHARA, N.; NUNEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 371-82, May 2003.
- IVANOV, II et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-33, Sep 22 2006.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 343-53, Apr 2015.
- JAMES, S. L.; GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **J Immunol**, v. 143, n. 12, p. 4208-12, Dec 15 1989.
- JOSE, P. J. et al. Identification of a second neutrophil-chemoattractant cytokine generated during an inflammatory reaction in the rabbit peritoneal cavity in vivo. Purification, partial amino acid sequence and structural relationship to melanoma-growth-stimulatory activity. **Biochem J**, v. 278 (Pt 2), p. 493-7, Sep 01 1991.
- KANNEGANTI, T. D. et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. **J Biol Chem**, v. 281, n. 48, p. 36560-8, Dec 01 2006.

- KARMAKAR, M. et al. Cutting edge: IL-1 β processing during *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRC4 and caspase-1. **J Immunol**, v. 189, n. 9, p. 4231-5, Nov 01 2012.
- KAWAI, T. et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, n. 1, p. 115-22, Jul 1999.
- KERR, I. B.; DE OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 103, n. 1, p. 11-20, Jul 1988.
- KETELUT-CARNEIRO, N. et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v. 194, n. 9, p. 4507-17, May 01 2015.
- KITAMURA, A. et al. An inherited mutation in NLRC4 causes autoinflammation in human and mice. **J Exp Med**, v. 211, n. 12, p. 2385-96, Nov 17 2014.
- KOFOED, E. M.; VANCE, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 592-5, Sep 29 2011.
- KONO, H. et al. The IL-1-dependent sterile inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C. **J Immunol**, v. 189, n. 7, p. 3734-40, Oct 01 2012.
- KOVACS, E. J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunol Today**, v. 12, n. 1, p. 17-23, Jan 1991.
- KUFER, T. A.; FRITZ, J. H.; PHILPOTT, D. J. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 8, p. 381-8, Aug 2005.
- KURASAWA, K. et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 11, p. 2455-63, Nov 2000.
- KURITA, N. et al. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 37, n. 1, p. 19-24, Feb 1999.
- KURITA, N. et al. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 38, n. 2, p. 177-82, Apr 2000.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 95-105, Jan 2009.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 22 2014.

- LANE, T. E. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1478-9, Apr 1994.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.
- LEBEL-BINAY, S. et al. Interleukin-18: biological properties and clinical implications. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 1, p. 15-26, Mar 2000.
- LEI, G. et al. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. **Cell Res**, v. 23, n. 7, p. 965-8, Jul 2013.
- LEIFER, C. A.; MEDVEDEV, A. E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. **J Leukoc Biol**, v. 100, n. 5, p. 927-941, Nov 2016.
- LENART, N.; BROUGH, D.; DENES, A. Inflammasomes link vascular disease with neuroinflammation and brain disorders. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 36, n. 10, p. 1668-1685, Oct 2016.
- LEVINSOHN, J. L. et al. Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002638, 2012.
- LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunol Rev**, v. 186, p. 8-18, Aug 2002.
- LIEPINSH, E. et al. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. **J Mol Biol**, v. 332, n. 5, p. 1155-63, Oct 03 2003.
- LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990.
- LIGHTFIELD, K. L. et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. **Nat Immunol**, v. 9, n. 10, p. 1171-8, Oct 2008.
- LIGHTFIELD, K. L. et al. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. **Infect Immun**, v. 79, n. 4, p. 1606-14, Apr 2011.
- LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013.
- LOURES, F. V. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 1078-88, Mar 2010.
- LOURES, F. V. et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1279-90, Jul 15 2009.

- LOURES, F. V. et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2470-80, Jun 2011.
- MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 10, p. 5243-8, May 13 1997.
- MAN, S. M. et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 20, p. 7403-8, May 20 2014.
- MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2007.
- MARIATHASAN, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 213-8, Jul 08 2004.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, Mar 09 2006.
- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 480, Jul-Aug 2010.
- MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 11-20, Sep 2015.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009.
- MARTINON, F.; TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **Trends Immunol**, v. 26, n. 8, p. 447-54, Aug 2005.
- MATUSIAK, M. et al. Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 5, p. 1541-6, Feb 03 2015.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298-300, Apr 12 2002.
- MENDES, R. P. **The gamut of clinical manifestation** Boca Raton: FL 1994.

- MENG, N. et al. Activation of NLRP3 inflammasomes in mouse hepatic stellate cells during *Schistosoma J.* infection. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 39316-39331, Jun 28 2016.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, Jul 6 2006.
- MIAO, E. A. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 569-75, Jun 2006.
- MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nat Immunol**, v. 11, n. 12, p. 1136-42, Dec 2010.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, Feb 2001.
- MOREIRA, A. P. et al. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Pathol**, v. 169, n. 4, p. 1270-81, Oct 2006.
- MOREIRA, A. P. et al. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ (2) and NO effector mechanisms. **Mycopathologia**, v. 166, n. 1, p. 17-23, Jul 2008.
- MORETO, T. C. et al. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 8, p. 473-8, Aug 2011.
- MORTIMER, L. et al. NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. **Nat Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1176-86, Oct 2016.
- MURAILLE, E. et al. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. **J Immunol**, v. 170, n. 8, p. 4237-41, Apr 15 2003.
- MURPHY, K. T., P.; WALPORT, M. . *Imunobiologia de Janeway* In: (Ed.). Porto Alegre: ArtMed, v.7 ed, 2010.
- MURUVE, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. **Nature**, v. 452, n. 7183, p. 103-7, Mar 06 2008.
- NAKAE, S. et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 6173-7, Dec 01 2003.

NASCIMENTO, F. R. et al. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4593-600, May 01 2002.

NASCIMENTO, M. S. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **J Infect Dis**, v. 211, n. 6, p. 1015-26, Mar 15 2015.

NGAI, P. et al. Gamma interferon responses of CD4 and CD8 T-cell subsets are quantitatively different and independent of each other during pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection. **Infect Immun**, v. 75, n. 5, p. 2244-52, May 2007.

NISHIKAKU, A. S. et al. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 2, p. 123-35, May 2009.

NOVAIS, F. O. et al. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1beta production. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 2, p. e1006196, Feb 2017.

OLIVEIRA, S. J. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, v. 4, n. 2, p. 139-44, Feb 2002.

PANAGIO, L. A. et al. Role of interleukin (IL)-18 in experimental paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 46, n. 5, p. 435-42, Aug 2008.

PARIS, S.; DURAN-GONZALEZ, S.; MARIAT, F. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. **Sabouraudia**, v. 23, n. 2, p. 85-92, Apr 1985.

PIETRELLA, D. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 3, p. 679-92, Mar 2013.

POECK, H. et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 63-9, Jan 2010.

POYET, J. L. et al. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. **J Biol Chem**, v. 276, n. 30, p. 28309-13, Jul 27 2001.

QU, Y. et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 539-42, Oct 25 2012.

QU, Y. et al. NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection. **J Exp Med**, v. 213, n. 6, p. 877-85, May 30 2016.

RAMOS, E. S. M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. **Acta Dermatovenereol Croat**, v. 12, n. 3, p. 173-80, 2004.

- RAMOS, E. S. M.; SARAIVA LDO, E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, v. 26, n. 2, p. 257-69, vii, Apr 2008.
- REGEV, D. et al. Heme oxygenase-1 promotes granuloma development and protects against dissemination of mycobacteria. **Lab Invest**, v. 92, n. 11, p. 1541-52, Nov 2012.
- ROBERTS, T. L. et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1057-60, Feb 20 2009.
- ROCKEY, D. C.; BELL, P. D.; HILL, J. A. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. **N Engl J Med**, v. 373, n. 1, p. 96, Jul 02 2015.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, Jan 2004.
- ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **Trends Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 183-9, Apr 2006.
- SAID-SADIER, N. et al. Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10008, Apr 02 2010.
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, p. 711-3, Mar 1988.
- SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Paracoccidioides brasiliensis: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia**, v. 62, n. 2, p. 77-86, Dec 16 1977.
- SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Variability of cell wall composition in Paracoccidioides brasiliensis: a study of two strains. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 31-40, Mar 1982.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-32, Mar 19 2010.
- SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 2, p. 296-313, Apr 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006.
- SILVA, G. K. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 β response and host resistance to Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 191, n. 6, p. 3373-83, Sep 15 2013.
- SOARES, A. M. et al. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of Paracoccidioides brasiliensis. **Immunology**, v. 102, n. 4, p. 480-5, Apr 2001.

- SOUTO, J. T. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1811-20, May 2000.
- SUBRAMANIAN, N. et al. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. **Cell**, v. 153, n. 2, p. 348-61, Apr 11 2013.
- SUN, Y. H.; ROLAN, H. G.; TSOLIS, R. M. Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **J Biol Chem**, v. 282, n. 47, p. 33897-901, Nov 23 2007.
- SUTTERWALA, F. S. et al. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. **J Exp Med**, v. 204, n. 13, p. 3235-45, Dec 24 2007.
- SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, Mar 17 2000.
- TAVARES, A. H.; BURGEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 7, p. e1004948, Jul 2015.
- TAVARES, A. H. et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2595, 2013.
- TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, Oct 2014.
- TODA, A.; PICCIRILLO, C. A. Development and function of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 3, p. 458-70, Sep 2006.
- TOMALKA, J. et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 12, p. e1002379, Dec 2011.
- TRISTAO, F. S. et al. 5-Lipoxygenase activity increases susceptibility to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect Immun**, v. 81, n. 4, p. 1256-66, Apr 2013.
- VAN DER MEER, J. W. et al. A low dose of recombinant interleukin 1 protects granulocytopenic mice from lethal gram-negative infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 5, p. 1620-3, Mar 1988.
- VELDHOEN, M.; STOCKINGER, B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. **Trends Immunol**, v. 27, n. 8, p. 358-61, Aug 2006.

VRANJAC, A. **Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidoidomicose. Secretaria de Estado da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilancia Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. São Paulo. 2008.**

WANG, X. et al. The Prostaglandin E2-EP3 Receptor Axis Regulates Anaplasma phagocytophilum-Mediated NLRC4 Inflammasome Activation. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 8, p. e1005803, Aug 2016.

WARREN, M. K.; VOGEL, S. N. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. **J Immunol**, v. 134, n. 2, p. 982-9, Feb 1985.

WILMANSKI, J. M.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; KOBAYASHI, K. S. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 1, p. 13-30, Jan 2008.

YAMASHIRO, L. H. et al. Isoniazid-induced control of Mycobacterium tuberculosis by primary human cells requires interleukin-1 receptor and tumor necrosis factor. **Eur J Immunol**, v. 46, n. 8, p. 1936-47, Aug 2016.

ZAMBONI, D. S. et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. **Nat Immunol**, v. 7, n. 3, p. 318-25, Mar 2006.

ZELANTE, T. et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 10, p. 2695-706, Oct 2007.

ZHANG, P. et al. Evolutionary implications for interactions between multiple strains of host and parasite. **J Theor Biol**, v. 248, n. 2, p. 225-40, Sep 21 2007.

ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596-600, Sep 14 2011.

ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nat Commun**, v. 7, p. 10760, Feb 23 2016.

ZOU, H. et al. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J Biol Chem**, v. 274, n. 17, p. 11549-56, Apr 23 1999.

8. Anexos

8.1 Anexo 1. Aprovação do comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 046/2015, sobre o projeto intitulado “*Envolvimento do inflamassoma de Nlr4 no controle da infecção por Paracoccidioides brasiliensis*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor João Santana da Silva** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de janeiro de 2016.

We certify that the protocol nº 046/2015, entitled “*Inflammasome involvement Nlr4 in controlling infection by P. brasiliensis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 01/27/2016.

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)3315-3301

8.2 Anexo 2. Tabela de sequência de iniciadores (primers) murinos utilizados na reação de qPCR.

Gene	Sequência sense (F)	Sequência anti-sense (R)
<i>B2m</i>	CAC CCC CAC TGA GAC TGA TAC ATA	TCA CAT GTC TCG ATC CCA GTA GA
<i>IL-18</i>	CAA ATC ACT TCC TCT TGG CC	TTT CCT TGA AGT TGA CGC AA
<i>Il-1β</i>	ATG GGC TGG ACT GTT TCT AAT G	AAT CAC GAA AAG GGA GCT CC
<i>Nlrp3</i>	GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC	CGG TGG TTG CTA GGA GAT GG
<i>Nlrc4</i>	TCT AGG AAC GTG GGA CGC TTT	TTTG AAT AAG GGC TCG TCT GTT