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

MATEUS SILVEIRA FREITAS

Imunomodulação por PCN: mecanismos da proteção
conferida contra a paracoccidioidomicose experimental

Ribeirão Preto – São Paulo
2015

MATEUS SILVEIRA FREITAS

**Imunomodulação por PCN: mecanismos da proteção conferida contra a
paracoccidioidomicose experimental**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira

Ribeirão Preto
2015

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

Catálogo da Publicação

Serviço de documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Freitas, Mateus Silveira

Imunomodulação por PCN: mecanismos da proteção conferida contra a paracoccidioidomicose experimental / Mateus Silveira Freitas; orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira. Ribeirão Preto, 2015
80f.

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. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

1.Lectina. 2.Imunomodulação. 3.Paracoccina recombinante. 4.Macrófagos. 5.Perfil M1

Dedico esse trabalho aos meus pais, minha madrinha, e a minha namorada, que me ajudaram na produção dessa dissertação me incentivando em momentos difíceis, vocês foram muito importantes, obrigado pela ajuda.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilson e Marina, pela ajuda durante esse trabalho, pelas conversas e por compreender as dificuldades de uma pós-graduação. Por sempre tentar me animar, quando chegava em casa com um resultado negativo. Muito Obrigado.

Aos meus irmãos, Mariana e Estêvão, pela amizade e apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, por me aceitar como orientando, pelos ensinamentos, conselhos e conversas, cresci muito durante esse período em seu laboratório. Obrigado por ser uma ótima pessoa e orientadora.

À Ana Flávia Oliveira Notário, minha namorada, por entender minha ausência, além de me ajudar a organizar minhas viagens entre Ribeirão Preto, Uberaba e Uberlândia. Muito obrigado, você é muito importante para mim.

À Ana Cláudia Paiva Alegre, por ser minha segunda orientadora dentro do laboratório, pelos vastos conhecimentos transmitidos, pela ajuda durante experimentos e amizade, meu muito obrigado.

À Aline Oliveira, Fabrício Freitas e Relber Gonçalves, o grupo paracoccina, pela imensa ajuda em conseguir a proteína recombinante, pela amizade e pelo auxílio em experimentos, essa dissertação seria totalmente diferente sem a participação de vocês.

Ao Thiago Aparecido, pela ajuda com discussões de resultados e propostas de novos experimentos, além da imensa ajuda nos últimos experimentos, obrigado.

À todos os amigos do laboratório de Glicobiologia. Marcel, Fausto, Aline Sardinha, Aline Oliveira, Rafael, Aninha, Thiago, Flávia, Lívia, André, Nerry, Ita, Sandro, Relber e Fabrício. Conversando com meus colegas do curso percebi que não poderia ter entrado em um ambiente de trabalho melhor que esse. Muito obrigado pelo ótimo convívio durante todo esse tempo, pelas risadas, pelos almoços no bandeirão, pelos churrascos, enfim, vocês fizeram a diferença.

À Sandra Maria Thomaz, pelo bom humor e ótimo astral durante esse período, pelas conversas e conselhos, pelos tempos de descanso ao lado da fonte tomando café, vou sentir falta.

À Patrícia e Érica Vendrusculo, pela ajuda dentro do laboratório, seja preparando materiais ou na parte administrativa. Agradeço também pela amizade.

À minha madrinha, Maria das Graças, pela imensa torcida para que tudo desse certo e pelas orações.

Aos meus amigos de curso, Alexandre, João Paulo, Karoline, Anna, Mikael, Gustavo, Luciano, Fabiana e Gabriela. Apesar do pequeno convívio durante as disciplinas e algumas festas, percebo o quanto crescemos juntos, obrigado por tudo.

Ao pessoal do badminton. A redescoberta desse esporte e o convívio com todos os praticantes me deram suporte durante vários períodos difíceis do desenvolvimento desse trabalho. Obrigado.

À Maria Helena, pela ajuda na autoclavação de materiais.

À Cláudia pela disponibilidade em me ajudar quando precisava usar equipamentos.

À Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, agradeço o conhecimento adquirido e a oportunidade de visualizar a imunologia de uma forma completamente diferente. Cresci muito durante esse período e vou levar esse conhecimento junto comigo para sempre.

À Profa. Mônica Hitomi e Prof. Geoffroy Malpass, por compreenderem e me ajudarem na reta final do mestrado.

À Ana Cristine, secretária do programa, obrigado pela ajuda na parte burocrática da pós-graduação.

À CAPES, CNPq e FAPESP pela ajuda financeira.

“Quando uma porta se fecha outra se abre; mas nós quase sempre olhamos tanto e de maneira tão arrependida para a que se fechou, que não vemos aquelas que foram abertas para nós.”

Alexander Graham Bell

RESUMO

FREITAS, M. S. **Imunomodulação por PCN: mecanismos da proteção conferida contra a paracoccidiodomicose experimental.** 2015. 80f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) é o agente causador da paracoccidiodomicose (PCM), doença endêmica na América Latina. A partir do reconhecimento de componentes fúngicos, macrófagos são ativados e adquirem propriedades que favorecem a eliminação do patógeno. Essas células produzem citocinas responsáveis pelo direcionamento da resposta adaptativa, sendo que o perfil Th1 é associado a proteção. Lectinas são proteínas que se ligam seletiva e reversivelmente a açúcares. Sua interação com glicanas da superfície de células da imunidade pode resultar em ativação e produção de citocinas, o que pode culminar em imunomodulação de efeito anti-infectivo. Nosso grupo trabalha com uma lectina de *P. brasiliensis*, denominada de Paracoccina (PCN) que se liga a N-acetilglicosamina. Assim, no presente trabalho objetivamos a produção de paracoccina recombinante (rPCN) expressa em *Pichia pastoris* e análise do papel ativador da rPCN em macrófagos. Demonstramos que esse organismo transformado secreta rPCN para o meio de cultura, com baixa contaminação de proteínas endógenas, o que possibilita o isolamento da proteína recombinante através de etapa cromatográfica única. Verificamos que a preparação obtida reproduz características da proteína nativa obtida de leveduras de *P. brasiliensis* e tem massa molecular aparente de 27 kDa. Demonstramos que rPCN estimula macrófagos murinos a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12p40 e TNF- α) e óxido nítrico (NO). Macrófagos estimulados com rPCN polarizam-se em direção ao perfil M1, como indicado pela maior expressão relativa de mRNA para iNOS2, SOCS3 e STAT1. Verificamos que TLR2 e TLR4 medeiam a ativação de macrófagos por rPCN, uma vez que a ausência de cada um desses receptores, com destaque para TLR4, afeta a produção de mediadores inflamatórios estimulada pelo componente fúngico. TLR4 é também responsável pela polarização de macrófagos em direção ao perfil M1, pois na ausência desse receptor não se detecta mensagem para iNOS2. Concluimos que o método de produção de rPCN via *P. pastoris* é eficiente e que a preparação obtida ativa macrófagos, levando-os a produzirem mediadores pró-inflamatórios e se polarizarem em direção ao perfil M1. Esses processos são essencialmente mediados por TLR4. Postula-se que paracoccina

seja um agonista de TLR4 capaz de desencadear respostas que, sabidamente, conferem proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

FREITAS, M. S. **PCN immunomodulation: mechanisms of protection conferred against experimental paracoccidioidomycosis.** 2015. 80f. Dissertation (Magister Scientiae degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic disease in Latin America. From the recognition of fungal components, macrophages are activated and acquire properties that favor the elimination of the pathogen. These cells produce cytokines that are responsible for directing the adaptive response, wherein Th1 immunity is protective. Lectins are proteins that bind selectively and reversibly to sugars. Their interaction with glycans in the surface of immune cell can result in activation and cytokine production, which may result in immunomodulatory anti-infective effect. Our group has been working with a lectin from *P. brasiliensis* called paracoccin (PCN) which binds to N-acetylglucosamine. In the present work we aimed to produce recombinant paracoccin (rPCN) expressed in *Pichia pastoris* and analysis of the role of rPCN in macrophages activation. We have demonstrated that this transformed organism secret rPCN to the culture medium and presents low contamination with endogenous proteins, which allows the isolation of recombinant protein by a single chromatography step. We found that the obtained preparation reproduces characteristics of the native protein from *P. brasiliensis* yeast and has apparent molecular mass of 27 kDa. We demonstrated that rPCN stimulates murine macrophages to produce pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-12 p40, and TNF- α) and nitric oxide (NO). Macrophages stimulated with rPCN polarize toward the M1 profile, as indicated by increased relative expression of iNOS2, SOCS3, and STAT1. We found that TLR2 and TLR4 mediate macrophage activation by rPCN, since the absence of each of these receptors, especially TLR4, affects the production of inflammatory mediators stimulated by the fungal component. TLR4 is also responsible for macrophage polarization toward the M1 profile, because in the absence of this receptor, the message to iNOS2 is not detected. We conclude that the method used to rPCN production, by *P. pastoris*, is efficient and that the obtained preparation is able to active macrophage, inducing them to produce pro-inflammatory mediators and polarize into the M1 profile. These processes are primarily mediated by TLR4. It is postulated that

Paracoccin corresponds to a TLR4 agonist, able to trigger responses that are known to provide protection against infection with *P. brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: célula apresentadora de antígeno

A/J: camundongos resistentes a PCM

B10.A: camundongos susceptíveis a PCM

CFU: unidades formadoras de colônias

ConA: concanavalina A

CRD: região de reconhecimento de carboidrato

CXCR: receptor de quimiocina do tipo CXC

DC: célula dendrítica

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

ELISA: ensaio imunoenzimático

FCεR: receptor da porção Fc de IgE

GlcNAc: N-acetilglicosamina

GM-CSF: fator de estimulação de colônias de monócitos e macrófagos

gp43: glicoproteína de peso molecular de 43 kDa de *P. brasiliensis*

HEK: células embrionárias de tecido renal

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IFN-γ: interferon-*gama*

IgY: imunoglobulina Y de galinha

iNOS2: óxido nítrico sintase induzível 2

IL: interleucina

kDa: quilodaltons

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano

min: minuto

NK: natural *killer*

NO: óxido nítrico

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos

Pam3CSK4: Pam3Cys-SKSKK

PBS: tampão salina fosfato

PBS-T: tampão salina fosfato + 0,05% Tween 20

PCM: paracoccidioidomicose

PCN: paracoccina nativa

PHA: fitohemaglutinina

PMN: células polimorfonucleares

PRR: receptores de reconhecimento padrão

PSM: mucina submaxilar suína

ROR γ t: fator de transcrição de linfócitos Th17

rPCN: paracoccina recombinante

seg: segundo

SFB: Soro fetal Bovino

TGF- β : fator de transformação do crescimento-*beta*

TgMIC: proteínas de micronema de *Toxoplasma gondii*

Th: perfil de resposta dependente de linfócito T

TLR: receptor do tipo Toll

TMB: tetrametilbenzamidina

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

V: volts

WT: animais do tipo selvagem

YPD: meio levedura peptonada dextrose

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Paracoccidioidomicose	16
1.2. Resposta imunológica gerada durante Paracoccidioidomicose	18
1.3. Lectinas e seu efeito imunomodulador	25
1.4. Paracoccina: uma lectina extraída de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	27
2 OBJETIVO GERAL	31
2.1. Objetivos Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Expressão e purificação da proteína recombinante em <i>Pichia pastoris</i>	33
3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	33
3.3. Coloração do gel por Prata	33
3.4. Eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose - Western blot	34
3.5. Purificação da rPCN em coluna de quitina	35
3.6. Ensaio de ligação a laminina	35
3.7. Ensaio de atividade N-acetil- β -D-glicosaminidase	36
3.8. Obtenção de macrófagos peritoneais	36
3.9. Detecção de mRNA em macrófagos estimulados (qPCR)	36
3.10. Dosagens de citocinas	38
3.11. Dosagem de óxido nítrico (NO)	39
3.12. Análise estatística	39
4 RESULTADOS	42
4.1. Produção e caracterização de rPCN produzida em <i>P. pastoris</i>	42
4.2. Ativação de macrófagos induzida pelo estímulo com rPCN	45
4.3. O estímulo de macrófagos com rPCN induz polarização M1	46
4.4. Importância de TLR2 e TLR4 na secreção de citocinas e na indução de perfil M1 em macrófagos estimulados com rPCN	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose

A primeira descrição de *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) foi realizada em 1908 por Adolf Lutz, no Brasil (LUTZ, 1908). Ele descreveu a existência de lesões na mucosa oral que se assemelhavam à carcinoma de células escamosas, mas que eram causadas por algum tipo de fungo. Mais tarde, em 1911, Alfonse Splendore descreveu outros casos causados pelo mesmo fungo e sugeriu a adoção da nomenclatura *Zymonema brasiliense*, para sua identificação. Floriano de Almeida, em 1930, a partir de estudos da infecção fúngica, em animais de laboratório, e do aspecto morfológico da doença, sugeriu uma nova nomenclatura: *Paracoccidioides brasiliensis*, a qual permanece até hoje. Desde 1971, a doença causada pelo *P. brasiliensis* é conhecida por Paracoccidioidomicose (PCM) (MARQUES, 2012).

A PCM é uma doença de prevalência em países da América do Sul, se estendendo do México até a Argentina, com uma alta incidência no Brasil. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina (Figura 1), mas somente 1 a 2% desenvolvem a forma clínica da doença (QUEIROZ-TELLES e ESCUISSATO, 2011). O regime de chuvas de uma região também pode influenciar na incidência da doença. Locais com altas taxas de precipitação anual (1,500 mm a 1,600 mm), florestas abundantes, presença de grandes rios e variação de temperatura, entre 17°C e 24°C, estão mais propensos ao aparecimento da PCM (COLOMBO et al., 2011).

Apesar da maior incidência em países da América do Sul, também há relatos de casos de PCM em outros países, como: Japão (KAMEI et al., 2003) Espanha (BUITRAGO et al., 2011) e Holanda (VAN DAMME et al., 2006). A expansão da PCM e de outras doenças fúngicas pode ser explicada por dois fatores principais: imunossupressão, causada por alguma doença depressora do sistema imune ou por fármacos utilizados no tratamento de várias doenças; e a globalização, que permite o fluxo de pessoas entre países de todos os continentes, levando ao surgimento da PCM em áreas não endêmicas (FERNANDEZ-FLORES et al., 2014).

Figura 1: Distribuição geográfica da PCM na América Latina. Adaptado de QUEIROZ-TELLES e ESCUISSATO, 2011.

A maioria dos estudos sugere que o habitat desse fungo seja o solo (BAGAGLI et al., 2008), onde *P. brasiliensis* é capaz de produzir e liberar artroconídeos (pequenos fragmentos miceliares), que podem infectar diferentes mamíferos, incluindo o homem, após sua inalação (GIRALDO et al., 1976; QUEIROZ-TELLES e ESCUISSATO, 2011).

P. brasiliensis é considerado um fungo dimórfico, por possuir duas formas diferentes durante seu ciclo de vida. No meio ambiente (25°C) é encontrado na forma de hifa, enquanto que no hospedeiro (37°C), se apresenta na forma de levedura. Uma vez que os artroconídeos alcançam o pulmão do hospedeiro humano, geralmente trabalhadores rurais do sexo masculino, ocorre sua transformação em levedura devido a fatores como mudança de temperatura, concentração de oxigênio e nutrientes (BRUMMER et al., 1993; SAN-BLAS et al., 2002). Inicialmente, a infecção é silenciosa, podendo ser seguida de tosse e presença de secreções pulmonares, além da instalação de um processo granulomatoso de evolução crônica (GIMENEZ et al., 1987; PAGLIARI e SOTTO, 2003), que geralmente afeta os pulmões, a cavidade oral, faringe, laringe, pele e linfonodos (LUPI et al., 2005). A infecção primária comumente ocorre

durante as duas primeiras décadas de vida, sendo regressiva em indivíduos imunocompetentes, que apresentam pouca ou nenhuma sintomatologia (BETHLEM et al., 1999).

As manifestações clínicas da PCM podem ser diversas, dependendo da idade, do sexo e do estado imunitário do hospedeiro, bem como da virulência da cepa de *P. brasiliensis*. A maioria dos indivíduos que entra em contato com o fungo são capazes de bloquear a infecção, permanecendo com o fungo sem desenvolver nenhum tipo de sintoma. Duas principais classificações são utilizadas para diferenciar as formas da PCM, embora várias outras tenham sido propostas (FERREIRA, 2009; AMEEN et al., 2010; QUEIROZ-TELLES e ESCUISSATO, 2011; MARQUES, 2012; ABREU E SILVA et al., 2013). São elas:

- Forma aguda ou juvenil: representa menos de 10% de todos os casos de PCM, atinge crianças de ambos os sexos e é fatal. Está relacionada com a supressão de resposta imune celular e aumento de anticorpos específicos circulantes. Órgãos como fígado, baço, medula óssea e linfonodos são comprometidos (ABREU E SILVA et al., 2013).
- Forma crônica ou adulta: representa a maioria dos casos de PCM e acomete homens, trabalhadores rurais, entre 30 e 50 anos de idade. A disseminação da doença ocorre de forma lenta. Processos granulomatosos são instalados principalmente na mucosa da cavidade bucal, gerando ulcerações que podem se estender até a língua, lábio, gengiva, palato mole e duro (QUEIROZ-TELLES e ESCUISSATO, 2011).

O tratamento da PCM é realizado de acordo com a forma da doença que o indivíduo apresenta. Para a forma crônica recomenda-se a utilização de itraconazol ou a combinação de sulfametoxazol e trimetoprima. Para a forma aguda, anfotericina B é mais recomendado, porém o tratamento é demorado podendo levar até dois anos. O diagnóstico de cura é dado a partir da avaliação de sinais clínicos, sorológicos e radiológicos (MARQUES, 2013).

1.2. Resposta imunológica gerada durante Paracoccidioidomicose

A instalação da PCM, sua disseminação e severidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como sua virulência e composição antigênica; condições ambientais; e talvez o mais importante, o estado imunológico em que se encontra o hospedeiro, ou seja, sua capacidade de montar uma resposta protetora (KUROKAWA et

al., 1998; KUROKAWA et al., 2005; CALICH et al., 2008; FORTES et al., 2011; RAMOS-E-SILVA et al., 2012).

Como uma primeira barreira à instalação da PCM podemos citar a imunidade inata, representada por células NK, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Um estudo realizado por PERACOLI et al., 1995, utilizando hamsters infectados por *P. brasiliensis*, demonstrou que durante o início da infecção, a atividade citotóxica de células NK estava acima da verificada pelas células do controle negativo. No entanto, a partir de 8 semanas de infecção, tal atividade começou a declinar; fato associado ao desenvolvimento de uma maior lesão tecidual e diminuição da resposta imune celular

Outro estudo demonstrou que células polimorfonucleadas (PMN), retiradas de sangue periférico de indivíduos normais (sem histórico de PCM), tiveram atividade citotóxica frente a leveduras de *P. brasiliensis*, quando estimuladas, ou não, com IFN- γ por 4 horas, demonstrando a efetividade dessas células na defesa do hospedeiro (KURITA et al., 2005). RODRIGUES et al., 2007 demonstraram que neutrófilos, obtidos de sangue periférico, são capazes de fagocitar e matar leveduras de *P. brasiliensis*, quando previamente estimulados com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF. Adicionalmente, verificou-se que tal efeito fungicida é dependente da produção de espécies reativas de oxigênio. A importância dos neutrófilos em modelo experimental de PCM foi demonstrada por MELONI-BRUNERI et al., 1996, utilizando-se de camundongos resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) à PCM. Nesse estudo verificou-se que, após quinze dias de infecção, camundongos resistentes possuem maior número de neutrófilos nos pulmões, que apresentaram maior *burst* oxidativo, produzindo mais espécies reativas de oxigênio quando comparados aos camundongos susceptíveis. Essa maior produção de espécies reativas se traduz em maior efeito fungicida *in vitro*.

A fundamental importância dos monócitos e macrófagos no controle da PCM foi demonstrada por KASHINO et al., 1995, a partir do bloqueio do sistema retículo endotelial. Tal estudo demonstrou que tanto camundongos A/J quanto B10.A se tornaram mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença, por apresentarem aumento e disseminação das lesões e maior mortalidade. CANO et al., 1995 demonstraram que macrófagos alveolares de camundongos A/J são capazes de produzir maiores quantidade de H₂O₂ em relação a camundongos B10.A, frente à PCM. Tal demonstração está relacionada ao menor número de unidades formadoras de colônias (CFU) encontrado nos camundongos A/J, bem como em uma melhor resposta imune adaptativa

desenvolvida por esses animais. Apesar dessa observação, PINA et al., 2008 constataram, utilizando-se dos mesmos camundongos, que macrófagos alveolares retirados de camundongos susceptíveis apresentaram maior capacidade fungicida, bem como maior produção de óxido nítrico (NO) e IL-12 e baixa produção de IL-10, quando ativados com IFN- γ ou IL-12. O oposto foi observado para os macrófagos retirados de camundongos A/J, os quais possuíam menor capacidade fungicida, associada à maior secreção de IL-10 e menor secreção de NO e IL-12. O quadro pró-inflamatório induzido pelos macrófagos alveolares de camundongos B10.A, em uma etapa inicial da infecção, não é capaz de gerar uma resposta adaptativa robusta, como demonstrado pela evolução da doença. Em contrapartida, a falta de controle no crescimento fúngico por parte dos macrófagos dos camundongos A/J não parece ser prejudicial ao animal que desenvolve uma forte resposta adaptativa, uma vez que se tornam capazes de controlar o desenvolvimento da PCM (Figura 2).

Figura 2: Hipótese das respostas imune inata e adaptativa frente a PCM experimental, de camundongos B10.A e A/J, mediada por macrófagos. Adaptado de CALICH et al., 2008.

Se corretamente ativados, esses macrófagos se tornam capazes de eliminar de forma eficiente a levedura em seu interior; caso contrário, o fungo se multiplica até a lise da célula. Devido à capacidade migratória dos macrófagos para órgãos imunes secundários, via vasos linfáticos, essas células apresentam dupla função na PCM: elas podem atuar como peça chave na disseminação do fungo ou na sua contenção (CALICH et al., 2008; BENARD, 2008). A incorreta ativação dessas células pode, ainda, induzir uma resposta adaptativa equivocada, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3: Resumo da regulação das citocinas associadas às três evoluções da PCM, baseado em dados utilizando a gp43. Pb: *P. brasiliensis*; MØ: macrófagos. Adaptado de BENARD, 2008.

Adicionalmente esses macrófagos podem ser divididos em dois tipos, de acordo com o modo através do qual forem ativados. Essa ativação pode ocorrer da forma clássica ou alternativa, dessa forma os macrófagos podem ser classificados como M1 ou M2, respectivamente, nomenclatura herdada das células Th. Tal diferenciação depende de estímulos externos, como interação com patógenos, ou sinalização via citocinas. Classicamente, sabe-se que LPS, TNF e IFN- γ induzem polarização M1 e IL-4, IL-13 e IL-10 induzem perfil M2 (MARTINEZ e GORDON, 2014). Macrófagos M1 são inflamatórios e contribuem para eliminação de várias classes de patógeno, secretam TNF- α , NO, IL-1, IL-12 e IL-23, sua ativação exacerbada pode resultar em destruição tecidual e contribuição na patogênese. Já as células M2 estão relacionadas com angiogênese, remodelação tecidual e reparo, essas células ainda secretam IL-10 e TGF- β (MURRAY e WYNN, 2011). A identificação desses subtipos de macrófagos pode ser realizada analisando a expressão de genes específicos relacionados com cada perfil de resposta. Óxido nítrico sintase induzível 2 (iNOS2) e o fator de transcrição STAT1

(transdutor de sinais e ativador da transcrição 1) são genes regulados positivamente em macrófagos M1, enquanto que em macrófagos M2, STAT3, Arginase 1 (Arg1), receptor de manose de macrófagos 1 (Mrc1; também conhecido como Cd206), *resistin-like-α* (Retnla; também conhecido como Fizz1) e quitinase 3-like 3 (Chi3l3; também conhecido como Ym1) são mais expressos. Além do aumento da expressão dos genes já citados, é descrito que há o aumento na expressão do gene supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3) em macrófagos M1 e aumento de SOCS1 em macrófagos M2, já que essas proteínas agem inibindo a via de sinalização de STAT3 e STAT1, respectivamente (LAWRENCE e NATOLI, 2011; WILSON, 2014).

Foi demonstrada a capacidade de células dendríticas (DC) em fazer essa ponte entre imunidade inata e adaptativa, em modelo utilizando a gp43, um conhecido antígeno altamente presente em *P. brasiliensis*. A imunização de camundongos resistentes à PCM com DCs, macrófagos e linfócitos B primados com gp43 foi capaz de induzir uma resposta dependente de linfócito T. Embora a imunidade adaptativa tenha sido ativada pelos três tipos celulares, as DCs se mostraram mais efetivas na indução de geração de uma resposta protetora Th1, com produção de IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos. Já macrófagos e linfócitos B geraram uma resposta não protetora, direcionando os linfócitos T para um perfil Th0 e Th2, respectivamente (FERREIRA et al., 2003).

No curso da PCM, PINA et al., 2013 constataram que o direcionamento de uma resposta pró-inflamatória, com alta produção de IL-12, TNF- α , IL-1 β e NO, iniciada por DCs de camundongos B10.A, é prejudicial ao controle da doença. Em contrapartida, DCs de camundongos resistentes secretam TGF- β e TNF- α , sendo capazes de induzir, a partir de linfócitos T virgens, a geração de linfócitos efetores e reguladores, o que não foi verificado em camundongos susceptíveis. Assim, o desenvolvimento de uma reação pró-inflamatória exacerbada pelas DCs não é capaz de gerar resposta de células T eficiente, apesar de controlar o crescimento fúngico nas etapas iniciais da PCM, contribuindo, dessa forma, para a disseminação do fungo, piorando o quadro do animal. Por outro lado, as DCs menos inflamatórias dos camundongos A/J são mais eficientes em unir a resposta imune inata com a adaptativa, gerando linfócitos T efetores e também reguladores.

Macrófagos e células dendríticas são consideradas células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais possuem vários receptores em sua superfície (LEE e KIM, 2007), que são capazes de reconhecer e, conseqüentemente, interagir com diferentes antígenos fúngicos. Após este reconhecimento, as APCs passam a expressar mais

moléculas co-estimuladoras em sua superfície, apresentam maior motilidade celular e secretam citocinas de perfis distintos (BUENTKE e SCHEYNIUS, 2003). Elas migram para órgãos linfóides secundários, com o intuito de apresentar antígenos processados para os linfócitos T, com participação de moléculas co-estimuladoras, como CD80, CD86 e CD40. Tal processo é acompanhado pela secreção de citocinas e resulta em montagem de resposta imune adaptativa efetora, dependente de linfócitos T. Dessa forma, as APCs atuam como ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; BROWN, 2011).

A interação do fungo com as APCs ocorre através de seus padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), com os receptores de reconhecimento padrão (PRR), presentes nas APCs. Os PRR melhor caracterizados são os receptores de tipo toll (TLR) e lectina tipo-C (CLR) (BROWN, 2006; VAN DE VEERDONK et al., 2008). O reconhecimento dos PAMPs por PRRs induz a ativação do sistema imune inato, iniciando a resposta contra o fungo. Células epiteliais, presentes na pele e mucosa, possuem receptores para os PAMPs e, dessa forma, são capazes de iniciar a resposta frente à infecção fúngica (ROMANI, 2004).

Em relação aos PRRs que reconhecem PAMPs de fungos, destaca-se a lectina do tipo-C, dectina-1, que reconhece β -glucanos. Dectina-1 facilita a fagocitose de partículas antigênicas e a ativação celular. A dectina-1 atua sinergicamente com TLR2 na produção de IL-10, IL-12 p40, IL-2 e ROS (GANTNER et al., 2003; ROGERS et al., 2005; BROWN, 2006). Outros PRRs importantes são TLR2, TLR4 e TLR9, que reconhecem PAMPs fúngicos, interagindo com zimosan, fosfolipomananas e DNA, respectivamente (VAN DE VEERDONK et al., 2008). A ativação desses receptores culmina em maior atividade fagocítica, indução do *killing* e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. É o balanço final do padrão de citocinas produzidas que regula o tipo de resposta celular gerada (GANTNER et al., 2003; LEE e KIM, 2007).

O balanço de sinais pró- e anti-inflamatórios é de vital importância na evolução de doenças fúngicas e requer a ação coordenada da imunidade inata e adaptativa. Apesar de a inflamação ser necessária para a proteção do hospedeiro, sua desregulação é prejudicial no quadro da PCM.

Ainda que importante a imunidade inata não é capaz de controlar de forma efetiva o crescimento e disseminação do fungo. Assim, a geração de uma resposta adaptativa dependente de linfócitos T CD4⁺ é de vital importância.

Linfócitos T CD4⁺ diferenciam-se em perfis celulares com peculiaridades distintas, variáveis quanto a efetividade no combate a vários patógenos. Em indivíduos resistentes à PCM, é característica a presença de linfócitos T CD4⁺ de perfil Th1. Este tipo de célula secreta IFN- γ , TNF- α e IL-12, citocinas que acarretam a ativação de macrófagos, neutrófilos e DCs, favorecendo a capacidade fungicida dessas células, propiciando o melhor controle da infecção e a formação de lesões granulomatosas mais organizadas (MEDNICK et al., 2003; ROMANI e PUC CETTI, 2008; NOSANCHUK e GACSER, 2008). A importância de IFN- γ e TNF- α foi atestada utilizando-se modelo de infecção em camundongos deficientes de IFN- γ (GKO) e do receptor de TNF- α (p55KO). Camundongos GKO apresentaram maior dano tecidual no pulmão, com presença de granulomas difusos e desorganizados, quando comparado ao controle. Além disso, 100% dos animais sucumbiram à PCM em apenas 16 dias de infecção. Já os camundongos p55KO apresentaram total incapacidade em formar granulomas. Ambos grupos de animais apresentaram carga fúngica aumentada em outros órgão, além do pulmão (SOUTO et al., 2000). CANO et al., 1998 constataram a importância de IFN- γ na PCM experimental, pela depleção dessa citocina, *in vivo*, através da utilização de anticorpos monoclonais. Observaram que tanto animais A/J quanto B10.A apresentavam exacerbada infecção pulmonar, associada à prematura disseminação do fungo para outros órgãos, como baço e fígado. Dessa forma, ficou demonstrado que independentemente do camundongo ser resistente ou susceptível à PCM experimental, a ausência de IFN- γ atua de forma maléfica para o hospedeiro. Em lesões de pele e boca de pacientes com PCM foi verificada grande produção de TNF- α , que pode estar sendo produzida por DCs (PAGLIARI e SOTTO, 2003). Essa citocina pode atuar no ambiente do granuloma de forma benéfica, induzindo o acúmulo e diferenciação de macrófagos em células epitelióides gigantes, ou maléfica, quando há sua produção exacerbada, causando dano tecidual (PARISE-FORTES et al., 2006).

Por outro lado, indivíduos que apresentam forma aguda da doença mostram incapacidade na geração de resposta Th1. Na maioria desses casos ocorre a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, sendo esse perfil de resposta incapaz de controlar a PCM (BENARD et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BENARD, 2008; FORTES et al., 2011). A presença de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10, em lesões de pele de pacientes com PCM pode representar um mecanismo pelo qual o fungo evade da resposta imune, já que esses indivíduos apresentam maior número de granulomas, os

quais são mais desorganizados (NEWORAL et al., 2003). Nesse sentido, a importância da IL-4 foi demonstrada por CAVASSANI et al., 2011. Tal estudo demonstrou que camundongos incapazes de produzir essa citocina, quando infectados com *P. brasiliensis*, apresentavam a formação de granuloma mais organizado em relação à camundongos normais. Ademais, nos casos de inflamação crônica e persistência do fungo, respostas Th17 e Th2 podem predominar (ROMANI e PUC CETTI, 2008). Células de sangue periférico de pacientes com infecção crônica apresentam produção aumentada de IL-17 e do fator de transcrição ROR γ t. Apesar desse perfil celular estar associado à resistência contra doenças fúngicas, a inflamação causada por essas células pode ser exacerbada, causando a destruição do tecido e fibrose, características comumente encontradas nesses pacientes (DE CASTRO et al., 2013).

A função de linfócitos T CD8⁺ na PCM ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se que na ausência dessa célula, a partir da depleção por anticorpos monoclonais *in vivo*, camundongos resistentes à PCM tendem a apresentar maior carga fúngica no baço e fígado, mas não no pulmão. Esse fenômeno é visto nos camundongos susceptíveis, porém em uma escala muito maior, demonstrando que a falta dos linfócitos T CD8⁺ é prejudicial nesses animais (CANO et al., 2000). Esse tipo celular está presente em quase todos os tipos de lesões, organizadas ou não, e apresenta grânulos citoplasmáticos contendo perforinas e granzimas B, o que demonstra sua ativação. Apesar de não ter efeito na organização do granuloma, esses linfócitos podem atuar destruindo células infectadas, como macrófagos e células gigantes (CANO et al., 2000; PAGLIARI et al., 2010). A presença desse tipo celular no granuloma pode ser ainda um indicativo de uma resposta funcional de linfócitos T CD4⁺, já que essas células são requeridas para a correta ativação dos linfócitos T CD8⁺.

1.3. Lectinas e seu efeito imunomodulador

O primeiro relato da detecção de lectina ocorreu em 1888, quando foi observada a capacidade do extrato de sementes de *Ricinus communis* de aglutinar hemácias de diferentes espécies animais (RUDIGER e GABIUS, 2001). Está estabelecido que lectinas são definidas como proteínas que possuem no mínimo um sítio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a um mono- ou oligossacarídeo específico (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Atribui-se a atividade ligante de carboidrato a um segmento polipeptídico da lectina designado “domínio de reconhecimento de carboidrato” (CRD) (DRICKAMER, 1988), constituído por cerca de 100 resíduos de

aminoácidos. Hoje, sabe-se que as lectinas são encontradas ubiquamente distribuídas na natureza, presentes desde vírus até humanos (SHARON, 2008).

A primeira lectina a ser isolada foi a Concanavalina A (ConA), a partir do extrato salino de sementes de *Canavalia ensiformis*. Posteriormente, foi demonstrado que a hemaglutinação promovida por ConA era inibida por sacarose, o que correspondeu a primeira evidência de que lectinas se ligam a açúcares (SUMNER e HOWELL, 1936). A lectina Fitohemaglutinina (PHA) foi a primeira a ser referida como capaz de interagir com células do sistema imune, fato evidenciado por sua capacidade em estimular a proliferação de linfócitos humanos (NOWELL, 1960). Essa capacidade linfoproliferativa foi reproduzida por ConA, que atua sobre linfócitos murinos. As lectinas exercem muitas atividades biológicas, dentre as quais se destacam o estabelecimento de interação célula-célula, desencadeamento de eventos da imunidade inata, direcionamento do desenvolvimento de linfócitos, indução na migração de leucócitos e promoção da adesão de patógenos a células hospedeiras (revisto por SHARON e LIS, 2004).

ArtinM, uma lectina que tem alta afinidade de ligação pela manotriose $\text{Man}\alpha 1-3$ [$\text{Man}\alpha 1-6$] Man, que constitui o “core” de N-glicanas, vem sendo estudada há vários anos por nosso grupo de pesquisa. Obtida da semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), ela exerce efeitos sobre várias células do sistema imune. A lectina ArtinM é capaz de interagir com glicanas dos receptores de superfície CXCR2 e TLR2 de neutrófilos, promovendo ativação celular (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994; GANIKO et al., 1998; PEREIRA-DA-SILVA et al., 2006). Essa lectina associa-se a glicanas do receptor Fc ϵ R de mastócitos, induzindo degranulação celular e liberação de mediadores inflamatórios (MORENO et al., 2003; BARBOSA-LORENZI et al., 2011). Além disso, ArtinM induz macrófagos e DCs a produzirem IL-12, acarretando a produção de IFN- γ e o estabelecimento de uma resposta imune do tipo Th1 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006). A imunomodulação desencadeada por ArtinM é atribuída ao reconhecimento de N-glicanas associadas a molécula de TLR2 (COLTRI et al., 2008). A administração de ArtinM confere proteção a camundongos infectados por patógenos intracelulares como, *P. brasiliensis*, *Neospora caninum*, *Candida albicans*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*, em decorrência da indução de imunidade Th1 e Th17 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006; COLTRI et al., 2010; CARDOSO et al., 2011; RUAS et al., 2012).

De forma semelhante a algumas lectinas extraídas de plantas, lectinas derivadas de patógenos também podem ter efeito imunomodulador. Por exemplo, as proteínas de micronema de *Toxoplasma gondii*, TgMIC1 e TgMIC4, reconhecem ácido siálico e galactose, respectivamente, e através dessa propriedade, ligam-se a glicanas associadas a TLR2 e TLR4 da superfície de macrófagos e DCs, promovendo ativação dessas células. Macrófagos de camundongos selvagens sob estímulo de TgMIC1, TgMIC4 ou da associação das duas lectinas, produzem NO, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL12 (p40) e IL-1 β , e tem a capacidade migratória aumentada, indicando a ocorrência de ativação celular. Ensaio similares utilizando macrófagos obtidos de camundongos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}, evidenciaram a notável dependência de TLR4 no efeito imunomodulador de TgMIC1 e TgMIC4. Além disso, a atividade fagocítica dos macrófagos derivados de camundongos selvagens aumentou sob estímulo dessas lectinas, atividade essa que também foi prejudicada na ausência de TLR4.

Outro exemplo de lectinas extraídas de patógenos é a Gal-lectin, tal lectina possui atividade imunomoduladora e é encontrada no protozoário *Entamoeba histolytica*. Essa lectina é capaz de atuar sobre DCs murinas induzindo sua ativação, manifestadas por aumento na expressão das moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86), bem como de MHCII e TLR2. Além disso, Gal-lectin direciona a resposta imune para o perfil Th1, através da indução de produção de IL-12 (KAMMANADIMINTI et al., 2004; IVORY e CHADEE, 2007). Outro estudo mostrou que a Gal-lectin leva macrófagos a produzirem TNF- α e NO, mediante estimulação prévia com IFN- γ (SEGUIN et al., 1997), mediadores considerados essenciais na proteção do hospedeiro contra a amebíase.

1.4. Paracoccina: uma lectina extraída de *Paracoccidioides brasiliensis*

Há algum tempo nosso grupo de pesquisa identificou uma proteína no extrato e sobrenadante de leveduras de *P. brasiliensis*. Essa proteína é fortemente reconhecida por soro de pacientes com PCM e foi denominada de paracoccina (PCN) (COLTRI et al., 2006).

A PCN é co-localizada com quitina na região de brotamento do fungo, fato demonstrado com o uso de anticorpos específicos. A incubação de anticorpos anti-PCN com a forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, levou a uma redução no CFU em 50,6%; além disso, as colônias apresentaram tamanho reduzido e alteração no padrão de distribuição de quitina na parede fúngica (GANIKO et al., 2007). Os efeitos provocados

pelo anticorpo anti-PCN sobre o crescimento do fungo em cultura revelam a importância da PCN para a biologia de *P. brasiliensis*. Ademais, foi verificado que a PCN interage de forma dose-dependente com laminina, glicoproteína da matriz extracelular, corroborando com a proposta de que essa proteína pode aumentar a patogenicidade do fungo. Foi demonstrado também que PCN liga-se reversível e seletivamente a N-Acetilglicosamina (GlcNAc), o que a caracteriza como lectina. Como esperado, a pré-incubação da PCN com GlcNAc promoveu a inibição da ligação entre a lectina e a laminina (COLTRI et al., 2006).

Os primeiros ensaios de interação da PCN com macrófagos murinos, evidenciaram a capacidade dessa lectina em induzir a produção de TNF- α e NO. Macrófagos estimulados com 0,25 mg/mL de PCN produziram altas concentrações de TNF- α no intervalo de 24 a 72h de cultivo celular. (COLTRI et al., 2006).

Foi demonstrado que, além de um domínio lectínico, a PCN possui um sítio catalítico, com atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase. Levando em consideração a estrutura multi-domínios da PCN e sua bifuncionalidade é possível propor que a PCN atue, não apenas nas células da imunidade do hospedeiro, mas também, desempenhe funções relacionadas ao remodelamento da parede celular em resposta a estímulos externos e ao crescimento fúngico, tanto de hifas como de leveduras (DOS REIS ALMEIDA et al., 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a administração profilática de PCN, produzida heterologicamente em *Escherichia coli* e denominada rPCN, confere proteção contra a PCM experimental. Camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com a rPCN e infectados com *P. brasiliensis* apresentaram uma redução no número de CFU em homogeneizados de pulmões. Os níveis pulmonares de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (citocinas de perfil Th1) estavam aumentados em animais aos quais administrou-se rPCN. Além disso, a análise histológica dos pulmões mostrou menor número de granulomas, de estrutura compacta e com poucos fungos no seu interior. Por fim, detectou-se aumento da expressão de receptor tipo toll 2 (TLR2) em células do pulmão dos animais tratados com rPCN, sugerindo que esses receptores da imunidade inata participam do mecanismo de proteção induzido pela rPCN (ALEGRE et al., 2014). Adicionalmente, foi demonstrado que, assim como a administração profilática da rPCN, a utilização dessa proteína em regime terapêutico de inoculação em camundongos infectados, foi benéfica para o animal. Isso foi confirmado pela detecção de menores números de granulomas pulmonares, os quais se apresentaram individualizados e bem

organizados, preservando, em grande extensão, a morfologia original do tecido. Nesse mesmo órgão ainda se encontravam aumentados os teores de mediadores pró-inflamatórios como NO, IL-12, TNF- α e IFN- γ , mas também IL-10 (sem níveis detectáveis de IL-4). Por fim, foi descrito que rPCN induz a produção de IL-12 por macrófagos peritoneais, indução esta associada à interação da rPCN com glicanas de receptores do tipo TLR2, conforme demonstrou o ensaio de estímulo por rPCN de células HEK293T transfectadas com TLR2 (ALEGRE-MALLER et al., 2014).

Esses dados indicam ser importante compreender a interação de rPCN com células do sistema imune inato, tendo presente o fato de que essas células estabelecem o contato inicial com o patógeno, além de direcionarem o perfil de resposta celular adaptativa dependente de células T a ser desenvolvida pelo hospedeiro. Dessa forma, torna-se importante definir as modificações imunológicas causadas em macrófagos a partir da interação com a PCN.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos exercidos pela forma recombinante de Paracoccina (rPCN) sobre macrófagos murinos, visando elucidar os mecanismos responsáveis pela imunidade protetora contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* conferida pela administração *in vivo* da forma recombinante desse componente fúngico.

2.1. Objetivos Específicos

- A. Expressar e purificar rPCN de *Pichia pastoris*
- B. Avaliar as atividades enzimática e lectínica da proteína recombinante
- C. Investigar o efeito de rPCN sobre macrófagos no que se refere a:
 - a. Produção de citocinas
 - b. Produção de NO
 - c. Polarização de resposta
- D. Investigar o papel de TLR2 e TLR4 na indução das respostas de macrófagos à rPCN.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Expressão e purificação da proteína recombinante em *Pichia pastoris*

A etapa de clonagem do gene padg_03347 foi desenvolvida durante o doutoramento de Ana Claudia Paiva Alegre, com a colaboração do estudante de iniciação científica Bruno Rodrigues de Souza. Para a expressão do gene padg_03347 em *P. pastoris*, utilizamos o vetor pGAPZ α -A (Invitrogen). A linhagem GS115 de *P. pastoris* foi utilizada por permitir a expressão de proteínas recombinantes em vetores que contém o gene HIS4 ou gene de resistência á Zeocina®. Uma colônia de *P. pastoris* transformada foi inoculada em 10 mL de meio líquido YPD e mantida a 30°C, 220 rpm, overnight. Após 16 horas, 500 μ L desta cultura foram transferidos para 300 mL de meio YPD fresco e incubados, por 72 horas, a 220 rpm, para a expressão da proteína de interesse. A proteína foi dialisada contra PBS e concentrada em sistema de ultradiafiltração (Amicon). A pureza das amostras foi verificada por SDS-PAGE 10%, na presença de agente redutor de pontes dissulfeto. As amostras foram mantidas a -20°C, até o momento do uso.

3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a separação eletroforética de proteínas foi utilizado o sistema de gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE 10% em tampão descontínuo. Todas as amostras foram preparadas na proporção 4:1 em relação ao tampão de amostra 5 X concentrado (tris HCl 260 mM, pH 6,8; SDS 7,3 %; β -mercapto-etanol 6,5 %; azul de bromofenol 0,2 % e sacarose 16,6 %) e fervidas a 95°C, por 10 min. Para a corrida eletroforética usou-se tampão de eletrodo (0,3 % tris-base, pH 8,3, 1,44 % glicina e 0,1 % SDS), com uma voltagem de 200 V e corrente de 70 mA por aproximadamente 2 h. O gel foi corado com azul de Coomassie (Pierce), ou prata. Os marcadores utilizados foram os contidos em mistura pré-corada (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), constituído de 6 proteínas cujas massas moleculares variaram de 20 a 120 kDa.

3.3. Coloração do gel por Prata

Após a corrida de eletroforese o gel foi fixado por uma hora sob agitação lenta (12 mL ácido acético; 50 mL metanol; 50 μ L formol para um volume final de 100 mL). O gel foi lavado três vezes com etanol 50 % por 20 min seguido de pré-tratamento (0,01

g tiosulfato de sódio; 25 mL água) deixou-se 1 min sob agitação vigorosa. O gel foi enxaguado por três vezes de 20 seg seguido da impregnação (0,05 g nitrato de prata; 75 µL formol; volume final de 50 mL) durante 20 min. Após esse período realizou-se o enxague por duas vezes de 20 seg e partiu-se para a revelação (1,5 g carbonato cálcio; 15 µL formol; 0,01 g tiosulfato de sódio; volume final de 50 mL) deixou-se sob agitação até o aparecimento das bandas (cerca de 2 min). Lavou-se uma vez com água destilada e adicionou-se solução de paralisação da reação (50 % metanol e 12 % ácido acético) durante 10 min.

3.4. Eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose - Western blot

Subsequentemente à corrida eletroforética, proteínas separadas em géis de poliacrilamida foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-P™, Amersham™). A transferência foi realizada overnight, a 50 V e corrente de 90 mA, utilizando-se tampão de transferência (1,895% tris-base, 9,09% glicina). A seguir, o gel foi corado com coomassie brilhante blue G 250, para averiguar a eficiência da transferência, enquanto a membrana foi corada por ponceau S (0,5 g ponceau, 2,5 mL ácido acético para 250 mL de água) por 3 min, a fim de observar as bandas transferidas e a eficiência do procedimento. O excesso do corante foi removido por rápidas lavagens da membrana com água destilada. As interações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das membranas com TBS-T 1 x (60,5 g/L tris-base, 87,6 g/L NaCl, 0,05 % tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico®), por 1 h sob agitação lenta a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 x com TBS-T 1 x por 5 min. Posteriormente, a membrana foi incubada em leite desnatado 1% contendo o anticorpo primário anti-proteína nativa e anti-proteína recombinante, produzidos em galinha (IgY). Os anticorpos foram diluídos nas proporções de 1:200 e 1:400. Após 1 h de incubação, foram realizadas três lavagens de 5 min com TBS-T 1 x à temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário produzido em coelho anti-IgY conjugado à peroxidase, na diluição 1:5000 em TBS-T 1 x acrescido de leite desnatado 1%. A incubação foi realizada por 40 min, sob agitação lenta a temperatura ambiente. Posteriormente, realizaram-se sete lavagens com TBS-T 1 x por 5 min. A membrana foi revelada com reagentes contendo substrato para a peroxidase Solução I (0,1 M tris HCl 1 M, pH 8,5, 2,5 mM, luminol, 0,9 mM ácido p-coumarico e água ultra-pura estéril) e Solução II (0,1 M tris HCl 1M,

pH 7,4, 0,018 % H₂O₂ e água ultra-pura estéril) na proporção de 1:1 por 30 s, e exposta a filmes radiográficos (Kodak®) por 10 s.

3.5. Purificação da rPCN em coluna de quitina

Uma coluna de quitina insolúvel, manufaturada em nosso laboratório (DOS REIS ALMEIDA et al., 2010) foi equilibrada com PBS (volume correspondente a 5 volumes de coluna). Aplicou-se à coluna o sobrenadante da cultura de *P. pastoris*, obtidos após 72 horas de cultivo e dialisado contra PBS. Após incubação de 1 hora, à temperatura ambiente, a coluna foi lavada com 20 volumes de PBS e procedeu-se a eluição em duas etapas, ou seja, com PBS 0,4 M Glicose ou Ácido acético 0,1%. Ambos eluatos foram dialisados contra água ultrapura e concentrados em Amicon de 10.000 MWCO e filtrados em filtros de 0,22 µm. A avaliação de pureza foi realizada através de eletroforese como descrito no item 3.2.

3.6. Ensaio de ligação a laminina

A avaliação da propriedade lectínica da rPCN foi testada através de ensaio lectino-imunoenzimático. Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 250 ng/poço de laminina diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9.6, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com solução de PBS-T acrescido com 3% de Gelatina inativado (solução de bloqueio), durante 1 hora, à 37°C. A placa foi novamente lavada três vezes e quantidades conhecidas da rPCN foram colocadas em cada poço em triplicata, seguindo-se incubação à temperatura ambiente durante 2 horas. Após cinco lavagens com PBS-T, anticorpos IgY primário anti-rPCN, diluído em PBS-T contendo 1% de gelatina, foram adicionados aos poços e incubados por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas novamente cinco vezes com PBS-T e a cada poço foi adicionado IgG murina biotinizada anti-IgY diluída em PBS-T 1% de Gelatina, seguindo-se novo períodos de 1 hora de incubação, à 37°C. Após nova etapa de lavagem adicionou-se o revelador tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce) e o substrato H₂O₂. Após 15 min, as reações foram bloqueadas com ácido sulfúrico 2 M e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – BioTek Instruments, INC).

3.7. Ensaio de atividade N-acetil-β-D-glicosaminidase

Para realizar esse ensaio utilizou-se tubo cônico de 1,5 mL, protegido da luz. Nesse tubo adicionamos 350 µL de acetato de sódio a 0,1 M pH 5,5, 100 µL de substrato 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide 5 mM (Sigma) e 5 µg total de proteína. Como controle positivo utilizamos o extrato total sonificado de *P. brasiliensis*, já que esse extrato sabidamente contém diversas quitinases (DOS REIS ALMEIDA et al., 2010; SANTANA et al., 2012). Os tubos foram postos em banho-maria à 37°C por 16 a 18 horas. Após esse tempo 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M foi adicionado e a leitura foi feita a 405 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – BioTekInstruments, INC).

3.8. Obtenção de macrófagos peritoneais

Administrou-se a camundongos C57BL/6 WT e knockouts para TLR2 (TLR2^{-/-}) ou para TLR4 (TLR4^{-/-}) 1 mL de tioglicolato 3% pela via intraperitoneal e, após 3 dias, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS gelado. Os lavados foram tratados com NH₄Cl/Tris por 10 min em gelo para remover hemácias, a seguir, as células foram lavadas 2 vezes para retirada do tampão de lise e ressuspensas para a contagem em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi ajustada para 5x10⁵ célula/poço, em placas de 48 poços e deixada em cultura overnight, em seguida, a placa foi lavada com PBS para retirar as células não aderentes e, posteriormente, foram adicionados LPS 1 ng/mL + IFN-γ 1 pg/mL como controle positivo, somente meio DMEM 10% SFB como controle negativo e rPCN na concentração de 5 µg/mL. Para os macrófagos TLR4^{-/-} foi utilizado Pam3CSK4 100 ng/mL como controle positivo.

3.9. Detecção de mRNA em macrófagos estimulados (qPCR)

Macrófagos obtidos como descrito anteriormente foram distribuídos (1,2x10⁶ células/poço) em microplacas e mantidos por 6 horas a 37°C, em ambiente contendo 5% de CO₂. Os devidos estímulos foram adicionados em triplicata: tendo como controles positivos IL-10 + IL-4 (50 pg/mL ambas), IFN-γ + IL-12 (2 pg/mL e 50 pg/mL, respectivamente) e, como controle negativo, somente meio DMEM 10% SFB. Utilizou-se rPCN na concentração de 5 µg/mL..

A extração de RNA total dessas células foi realizada com Trizol Reagent[®] (Invitrogen Life Technologies, EUA), segundo o protocolo do fabricante. Brevemente,

as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de Trizol e incubadas à temperatura ambiente, por 5 min. Em seguida, o RNA total foi extraído adicionando-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 min, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico (Sigma Chemical CO.). As amostras foram brevemente vortexadas e centrifugadas a 12000 x g por 10 min. O sedimento de RNA foi vortexado e lavado com 1 mL de etanol 75%, seguindo-se centrifugação a 7500 x g, por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o RNA ressuspense em 10 µL de água livre de DNase e RNase (Invitrogen Life Technologies), seguido pela quantificação em espectrofotômetro.

Para a transcrição reversa (RT), as amostras foram tratadas com 1 U de DNase (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante, e então convertidas em cDNA por transcrição reversa, sendo cada reação preparada em um volume final de aproximadamente 22 µL. Previamente, todo o RNA e 20 pmol de Oligo dT (Invitrogen Life Technologies), foram incubados a 70°C por 5 min, e em seguida, mantidos em gelo por mais 5 min. Decorrido esse tempo, foi adicionado às amostras, uma mistura contendo 1 M de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (100 mM dNTP Set, PCR Grade, Invitrogen Life Technologies), 20 unidades de inibidor de RNase (RNaseOut Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen Life Technologies), 1 U de transcriptase reversa (ImProm-II Reverse Transcriptase, Promega Corporation, Madison, EUA), 3 mM de MgCl₂ e 4 µL de tampão da reação. A reação de RT foi realizada segundo instruções do fabricante. A mistura foi incubada por 5 min a 25°C, seguida de 60 min a 42°C e 15 min a 70°C. As amostras foram então tratadas com 10 µg de RNase (Invitrogen Life Technologies), por 30 min a 37°C.

As reações de PCR em Tempo Real foram feitas em volume final de 15 µL, contendo 0,75 µL de cDNA (40 ng), 0,5 pmol de cada primer e 7,5 µL de Sybr Green[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA), contendo 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, dCTP e dGTP, 400 µM de dUTP, 1,25 unidades de AmpliTaq GoldR DNA polimerase e 0,5 unidades de AmpEraseR uracil-N-glicosilase (UNG). O volume final de reação foi atingido adicionando-se água livre de DNase e RNase (Invitrogen Life Technologies). As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7500, da Applied Biosystems, com os seguintes parâmetros: 50°C por 2 min, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 15 seg / 60°C por 1 min. As expressões relativas de cada

gene foram obtidas utilizando-se o método comparativo delta Ct, tendo como controle endógeno o gene β -actina.

Sequências dos primers específicos:

Primers	Sequência (5' - 3')
β -actina S AS	CCTAAGGCCAACCGTGAAAA GAGGCATACAGGGACAGCACA
Ym1 S AS	TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG ACTCCCTTCTATTGGCCTGTCC
Arginase-1 S AS	GTTCCCAGATGTACCAGGATTC CGATGTCTTTGGCAGATATGC
FIZZ1 S AS	CCTGAGATTCTGCCCCAGGAT TTCAGTGGGACCATCAGCTGG
iNOS2 S AS	CCGAAGCAAACATCACATTCA GGTCTAAAGGCTCCGGGCT
STAT1 S AS	CACGCTGCCTATGATGTC CCTGGAGATTACGCTTGC
STAT3 S AS	GGCACCTTGGATTGAGAG TGCTGATAGAGGACATTGG
SOCS1 S AS	AGGATGGTAGCACGCAAC GAAGACGAGGACGAGGAG
SOCS3 S AS	AGGAGAGCGGATTCTACTG TCACACTGGATGCGTAGG
TLR2 S AS	CTCTGACCCGCCCTTTAAGC TTTTGTGGCTCTTTTCGATGG
Dectina-1 S AS	GTGCTGGGTGCCCTAGCAT TCTGTGGGCTTGTGGTTCTCTT
IL-23 p19 S AS	TCCGTTCCAAGATCCTTCGA TGTTGGCACTAAGGGCTCAG

3.10. Dosagens de citocinas

A dosagens das citocinas IL-12 p40, TNF- α e IL-6 foram procedidas no sobrenadante de cultura de células, por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se

o Kit OptEIA™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 50 µL/poço de anticorpo de captura específico para cada citocina testada, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0.1 M e pH 9.6, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com solução de PBS acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado (solução de bloqueio) (Sigma), durante 1 hora, à temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionadas, em duplicata, quantidades conhecidas das citocinas recombinantes (curva-padrão) ou sobrenadante da cultura de células, seguindo-se incubação à temperatura ambiente, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e foram adicionados os anticorpos secundários biotinilados (anticorpo de detecção) específicos para cada citocina, diluídos, que foram pré-incubados por 15 min com avidina conjugada a peroxidase. A solução foi adicionada às placas, seguindo-se incubação à temperatura ambiente durante 1 hora. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o revelador TMB (Pierce) e o substrato H₂O₂. As reações foram bloqueadas após 15 min com ácido sulfúrico 2 M e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – BioTek Instruments, INC).

3.11. Dosagem de óxido nítrico (NO)

A concentração de NO no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados foi inferida pela determinação de nitrito, utilizando o método de Griess (GREEN et al., 1981). Em placas de 96 poços, 50 µl do sobrenadante da cultura foram incubados com igual volume do reagente de Griess por 10 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, a absorbância (DO 540 nm) foi determinada em leitor de microplacas (Power Wavex- BIO-TEK). Os resultados expressos em µM foram determinados por comparação com a curva padrão feita com nitrito de sódio (NaNO₂) em concentrações de 200 a 0,78 µM.

3.12. Análise estatística

Os resultados estão representados como média ± SEM. A análise estatística dos diferentes experimentos foi realizada através do software *GraphPadPrism software* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores passaram pela análise de variância homogênea e assumiram uma distribuição Gaussian, então foi utilizado o teste

one-way ANOVA com o pós-teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1. Produção e caracterização de rPCN produzida em *P. pastoris*

A produção da rPCN foi realizada em organismo eucarioto (*P. pastoris*) transformado. Após três dias de cultura em meio YPD, uma amostra do sobrenadante foi coletada e testado para verificar a produção de rPCN e sua secreção para o meio de cultura. O perfil eletroforético do sobrenadante se mostrou limpo, apresentando pouca contaminação com outras proteínas. Três bandas foram observadas, sendo que a majoritária migrou como uma proteína de 27kDa, massa molecular correspondente à da PCN (Figura 4).

Figura 4: Expressão da PCN recombinante expressa em *P. pastoris*. O perfil de expressão da *P. pastoris* demonstra baixa contaminação por outras proteínas, assim como a produção majoritária de uma proteína de 27 kDa. Gel SDS-PAGE 10% corado com *comassie brilliant blue*. 1: Marcador proteico. 2: sobrenadante da cultura de *P. pastoris*.

A purificação da proteína foi procedida por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de Quitina (constituída de polímeros de N-acetilglicosamina). Tal escolha foi feita levando-se em consideração o fato de que o CRD da PCN tem afinidade por esse açúcar. Podemos observar, na Figura 5, que preparação de alta homogeneidade foi obtida pela eluição do material retido na coluna com ácido acético. Em contrapartida, a proteína não se dissociou da coluna pela tentativa de eluição com Glicose; esse fato foi atribuído à baixa afinidade de rPCN por esse monossacarídeo, incapaz de competir com a alta afinidade pelo polímero de GlcNAc imobilizado.

Figura 5: Purificação em coluna de quitina da rPCN obtida pela expressão em *P. pastoris*. A purificação da rPCN em coluna de quitina eluída com ácido acético (pista 2), mas não com glicose (pista 1), proporcionou bom rendimento (observe a banda de 27kDa). Gel SDS-PAGE 10% corado com comassie brilhante azul. M: Marcador proteico. 1:Eluição com glicose 0,4M. 2: Eluição com ácido acético 0,1%.

Para confirmar que a proteína recombinante expressa em *P. pastoris* realmente corresponde à paracoccina, realizamos o ensaio de *imunoblotting* com anticorpos produzidos em galinha (IgY) contra a proteína recombinante (produzida em *E. coli*) e contra a preparação enriquecida de PCN nativa. Em ambos os casos, foi possível observar a marcação para a proteína recombinante no tamanho esperado de 27 kDa (Figura 6), indicando tratar-se de PCN.

Figura 6: Western blot de rPCN obtida pela expressão em *P. pastoris*. Anticorpos anti-PCN (forma nativa) e anti-rPCN reconhecem a proteína obtida pela expressão em *P. pastoris* e purificada por afinidade à quitina. M: Proteínas marcadoras de massa molecular; 1: reação com anticorpo anti-proteína nativa diluído 1:400; 2: reação com anticorpo anti-proteína recombinante

diluído 1:400; 3: reação com anticorpo anti-proteína recombinante diluído 1:200. Tempo de exposição: 10 segundos.

Para melhor caracterização da proteína, verificamos se a rPCN obtida pela expressão em *P. pastoris* era dotada das atividades lectínica e enzimática, como previamente descrito para a proteína nativa (COLTRI et al., 2006; DOS REIS ALMEIDA et al., 2010). A Figura 7 mostra, a partir dos resultados de ensaios específicos, que a rPCN reproduz as capacidades de ligação à laminina e de exercer atividade N-acetil glucosaminidase. A presença da rPCN no sobrenadante de cultura é detectada desde o primeiro dia de cultura, como mostra o painel 7A, uma vez que todas as preparações se ligaram à laminina. O painel B mostra que duas preparações independentes de rPCN possuem alta atividade de N-acetil β -D-glicosaminidase. Assim, confirmamos que a forma recombinante de paracoccina, obtida pela expressão em *P. pastoris*, reproduz as atividades já descritas para a proteína nativa, denotando uma preservação de funções da proteína nativa.

Figura 7: Ensaios funcionais da rPCN produzida em *P. pastoris*. A: O ensaio lectino-imunoenzimático, utilizando uma placa sensibilizada com laminina, mostra que a proteína proveniente de *P. pastoris* retém a capacidade lectínica demonstrado para a proteína nativa de *P. brasiliensis*. As três diferentes preparações (1, 2 e 3) se referem a dias de cultivos diferentes. B: Duas preparações independentes de rPCN foram testadas quanto a sua atividade N-acetil-glucosaminidase, ambas preparações desempenharam atividade enzimática. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ em relação ao controle negativo.

4.2. Ativação de macrófagos induzida pelo estímulo com rPCN

Sabendo-se que macrófagos desempenham papel crítico no curso da PCM, propusemo-nos a investigar as repercussões funcionais do estímulo dessas células com rPCN. A Figura 8 mostra haver produção significativamente aumentada de TNF- α , IL-12p40 e NO, em relação ao controle negativo, por macrófagos peritoneais de camundongos C56BL/6 que foram estimulados com rPCN (5 μ g/ml). A produção das citocinas ocorre em quantidades similares às proporcionadas pelo controle positivo e de forma contínua, nos três tempos testados.

Verificamos também que esses macrófagos, estimulados com rPCN, exibem expressão relativa aumentada para IL-23 e TLR-2, sendo tais níveis cerca de 16 e 5,5 vezes maiores do que os verificados no controle negativo. Por outro lado, não houve diferença de expressão de mensagem para Dectina-1 entre os grupos (Figura 9).

Figura 8: O estímulo de macrófagos com rPCN induz a produção de mediadores inflamatórios. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados com 5,0 μ g/ml de rPCN. A quantificação de IL-12 p40 e TNF- α no sobrenadante dessas células foi realizada por ELISA. A dosagem de NO foi realizada utilizando o método de Griess. O controle negativo consistiu de meio DMEM 10% SFB e polimixina. Como controle positivo utilizou-se

de LPS 1µg/ml + INF-γ 1ng/ml. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ em relação ao controle negativo de cada experimento.

Figura 9: O estímulo com rPCN aumenta a expressão de mRNA para TLR2 e IL-23. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados com 5,0µg/ml de rPCN por seis horas. LPS (1µg/ml), Pam3CSK4 (100ng/ml) ou IFN-γ (1ng/ml) + IL-12 (50ng/ml) foram utilizados como controles positivos. O controle negativo consistiu de meio DMEM 10% SFB. O mRNA foi extraído com Trizol Reagent®, segundo recomendações do fabricante, o cDNA foi obtido a partir de transcrição reversa. A reação de PCR em tempo real foi realizada em Sistema de PCR em Tempo Real 7500, da Applied Biosystems. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ diferença estatística com relação ao controle negativo de cada experimento.

4.3. O estímulo de macrófagos com rPCN induz polarização M1

Constatado os aumentos da produção de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de mRNA para TLR2 e IL-23, avaliamos se esses macrófagos estimulados com rPCN poderiam estar se diferenciando em um perfil M1. Nossos resultados demonstram que tais células não apresentam aumento significativo da expressão relativa para marcadores de perfil M2 (Arginase-1, Ym1 e FIZZ1), em relação às células do

controle negativo. Em contrapartida ao analisarmos mensagem para iNOS2 verificamos um aumento de cerca de 215 vezes na sua expressão relativa (Figura 10), frente ao estímulo com rPCN. Para melhor caracterizar esse perfil de ativação avaliamos a expressão de STAT1, STAT3, SOCS1 e SOCS3. Constatamos que o estímulo com rPCN aumentou cerca de 10 e 380 vezes a expressão relativa de STAT1 e SOCS3, respectivamente. Além disso, o quociente entre as expressões de SOCS3 e SOCS1 mostra ter ocorrido uma expressão 15 vezes maior de SOCS3 em relação a SOCS1 (Figura 11).

Figura 10: rPCN induz a polarização de macrófagos para perfil M1. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados com 5,0µg/ml de rPCN por seis horas. LPS (1µg/ml), Pam3CSK4 (100ng/ml), IL-10 + IL-4 (50ng/ml ambas) ou INF-γ (1ng/ml) + IL-12 (50ng/ml) foram utilizados como controles. O controle negativo consistiu de meio DMEM + 10% SFB. O mRNA foi extraído com Trizol Reagent®, segundo recomendações do fabricante, o cDNA foi obtido a partir de transcrição reversa. A reação de PCR em tempo real foi realizada em Sistema de PCR em Tempo Real 7500, da Applied Biosystems. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ em relação ao controle negativo de cada experimento.

Figura 11: rPCN induz alta expressão relativa de SOCS3 e STAT1. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados com 5,0µg/ml de rPCN por cinco horas e meia. LPS (1µg/ml), Pam3CSK4 (100ng/ml), IL-10 + IL-4 (50ng/ml ambas) ou INF-γ (1ng/ml) + IL-12 (50ng/ml) foram utilizados como controles. O controle negativo consistiu de meio DMEM + 10% SFB. O mRNA foi extraído com Trizol Reagent®, segundo recomendações do fabricante, o cDNA foi obtido a partir de transcrição reversa. A reação de PCR em tempo real foi realizada em Sistema de PCR em Tempo Real 7500, da Applied Biosystems. (***) p<0,001, (**) p<0,01 e (*) p<0,05 em relação ao controle negativo de cada experimento.

4.4. Importância de TLR2 e TLR4 na secreção de citocinas e na indução de perfil M1 em macrófagos estimulados com rPCN

Devido a importância de TLRs no desencadeamento de ativação de macrófagos, investigamos se a ausência de TLR2 ou TLR4 afetaria a produção de citocinas e a polarização dos macrófagos estimulados com rPCN. A Figura 12 confirma a observação de que, sob estímulo de rPCN, macrófagos de camundongos WT aumentam a produção das citocinas avaliadas. Quando macrófagos TLR2^{-/-} foram estimulados e comparados a células WT a produção de IL-6 e de TNF- α não foi afetada, enquanto a de IL-12p40 sofreu diminuição significativa. O efeito da ausência de TLR4 foi mais drástico, uma vez que macrófagos TLR4^{-/-} sob estímulo de rPCN produziram baixas concentrações de IL-6 e não produziram teores detectáveis de TNF- α e IL-12p40.

Figura 12: A falta de TLR4 prejudica a ativação de macrófagos estimulados com rPCN. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} foram estimulados com 5,0 μ g/ml de rPCN. A quantificação de IL-12 p40, TNF- α e IL-6 no sobrenadante das culturas foi realizada por ELISA. O controle negativo consistiu de meio DMEM + 10% SFB e o controle positivo de LPS 1 μ g/ml + IFN- γ 1 ng/ml para os macrófagos WT e TLR2^{-/-} para os macrófagos TLR4^{-/-} foi utilizado Pam3CSK4 100 ng/ml. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ em relação ao controle negativo de cada experimento.

Verificada a importância de TLR2 e TLR4 para a produção de citocinas inflamatórias, propusemo-nos a avaliar se a falta desses receptores afetaria a polarização M1 desses macrófagos. A Figura 13 mostra que o estímulo com rPCN não aumenta a expressão de mRNA de nenhum dos marcadores clássicos de macrófago M2, em quaisquer das circunstâncias ensaiadas. Já a expressão de mRNA para iNOS2 aumentou cerca de 80 vezes quando macrófagos WT ou TLR2^{-/-} foram estimulados com rPCN. Já na falta de TLR4, houve importante queda na expressão relativa de mRNA para iNOS2, igualando-se aos níveis verificados no controle negativo (meio).

Figura 13: A falta de TLR4 impede a polarização de macrófagos M1 induzida por rPCN. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados com 5,0µg/ml de rPCN por seis horas. LPS (1ug/ml), Pam3CSK4 (100ng/ml), IL-10 + IL-4 (50ng/ml ambas) ou IFN-γ (1ng/ml) + IL-12 (50ng/ml) foram utilizados como controles positivos. O controle negativo consistiu de meio DMEM + 10% SFB. O mRNA foi extraído com Trizol Reagent®, segundo recomendações do fabricante, o cDNA foi obtido a partir de transcrição reversa. A reação de PCR em tempo real foi realizada em Sistema de PCR em Tempo Real 7500, da Applied Biosystems. MO: macrófago. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ diferença estatística com relação ao controle negativo de cada experimento.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Motivados por evidências prévias de que a administração de paracoccina confere proteção a camundongos contra a infecção por *P. brasiliensis*, no presente estudo avaliamos o efeito exercido *in vitro* pelo estímulo de macrófagos com a forma recombinante de paracoccina, visando elucidar possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito desse componente fúngico sobre a imunidade do hospedeiro. Verificamos que rPCN atua sobre macrófagos determinando sua ativação, manifestada pela produção de mediadores inflamatórios, e sua polarização para o perfil M1. Constatamos que esses efeitos são essencialmente mediados por TLR4.

Em estudos anteriores, nosso laboratório utilizou PCN recombinante obtida a partir da expressão em *E. coli* e enfrentou dificuldades nos procedimentos de purificação e eliminação de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Tais fatos nos levaram a retomar abordagem anteriormente explorada em nosso laboratório, referente à utilização de um organismo eucarioto, no caso a levedura *Pichia pastoris*, para expressar rPCN. O uso de leveduras em sistemas heterólogos tem sido reconhecido como uma opção vantajosa, pois resulta em maior produção das proteínas de interesse, além de permitir que tais proteínas sejam secretadas para o meio de cultura, com pouca contaminação de proteínas endógenas da levedura e de LPS, além de outras endotoxinas, facilitando as etapas de purificação subsequentes. Adicionalmente, por se tratar de um organismo eucarioto, *P. pastoris* promove várias modificações pós-traducionais na proteína heteróloga, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico, culminando no correto processamento da proteína recombinante (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; MATTANOVICH et al., 2012). Devido a tais modificações, o passo adicional de *refolding* da proteína é evitado, acelerando o processo de purificação.

Obtivemos, assim, a proteína recombinante produzida pela levedura *P. pastoris* como modelo de expressão eucarioto. Além das citadas vantagens, esse modelo traz riscos. É sabido, por exemplo, que a utilização desse organismo para a expressão de proteínas heterólogas pode resultar na hiperglicosilação da proteína recombinante obtida, eventualmente alterando as características naturais da proteína nativa. HEIMO et al., 1997 utilizando a mesma estratégia para a produção de uma proteína derivada de *Aspergillus awamori* demonstrou que a massa molecular da proteína secretada era 20 kDa superior à da proteína nativa. Cerca de 10 kDa foram atribuídos à N-glicosilação, e

os 10 kDa restantes à O-glicosilação. Apesar desse aumento de massa molecular, a glicosilação em *P. pastoris* ainda é bem menor do que em *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observado ainda que antitrombina III produzida em *P. pastoris* é adicionada de O-glicanas em posição próxima do sítio ativo da proteína e que essa modificação diminuiu em 50% sua capacidade de inibir a trombina (MOCHIZUKI et al., 2001). No caso da rPCN expressa em *P. pastoris*, não houve adição exagerada de açúcares, já que não se detectou alteração da massa molecular e nem das atividades desempenhadas pela proteína nativa.

A purificação da proteína recombinante foi realizada utilizando cromatografia de afinidade, método que leva em conta a característica das lectinas de ligação a açúcares específicos e é amplamente utilizado. SINGH et al., 2015 purificou uma lectina micelial de *Aspergillus sparsus* utilizando uma coluna contendo em sua matriz sepharose conjugada a mucina, glicoconjugado alvo de reconhecimento pela lectina descrita. Devido à interação da lectina com seu glicoalvo, o processo de purificação pode ser encurtado, tornando desnecessários passos adicionais, aumentando a eficiência da purificação. Além da utilização de grandes moléculas, como glicoconjugados, para a purificação de lectinas, é possível utilizar monossacarídeos conjugados à sepharose. Por exemplo, para purificar galectina-1 mutada no seu sítio CRD, foi utilizada estratégia que levou em conta a demonstração de que os mutantes retinham a capacidade de ligação somente à Galactose β 1–4Fucose; esse carboidrato imobilizado proporcionou uma forma rápida e simples de purificar as galectinas mutadas (TAKEUCHI et al., 2015).

Demonstramos que a rPCN produzida em *P. pastoris* possui atividade enzimática, clivando polímeros GlcNAc, além de atividade lectínica, demonstrada através da ligação a laminina, bem como através do próprio método de purificação da proteína, utilizando o açúcar específico imobilizado. De maneira semelhante ao observado para a rPCN, a produção heteróloga de uma lectina de *Aleuria aurantia*, denominada AAL, não alterou suas propriedades funcionais; a proteína recombinante produzida apresentou atividade hemaglutinante similar à descrita para a proteína nativa, com a vantagem adicional de possuir maior termoestabilidade, devido a glicosilação (AMANO et al., 2003). Entretanto, já foi descrito que outras proteínas produzidas por esse sistema podem diferir ligeiramente da nativa, perdendo atividade ou alterando a massa molecular. A forma recombinante de frutalina, uma lectina extraída de sementes de *Artocarpus incisa* (fruta-pão), produzida em *P. pastoris*, é capaz de reconhecer, de forma altamente específica, glicanas presentes em células malignas da próstata. No

entanto, não é capaz de aglutinar eritrócitos humanos, como a frutalina nativa (OLIVEIRA et al., 2014). A capacidade hemaglutinante também foi perdida por PDL-F, uma lectina de *Pleurotus cornucopiae* (cogumelo-ostra-dourado), quando expressa em *P. pastoris*. A ausência dessa característica foi atribuída à conformação incorreta da proteína recombinante, já que a glicosilação em sítios específicos pode inibir a formação de dímeros, que ocorre na proteína nativa; a despeito desse fato, o CRD da lectina parece estar intacto, como indica a ligação a PSM (mucina suína) (IIJIMA et al., 2003).

Macrófagos e células dendríticas são sentinelas do sistema imune inato presentes em quase todos os tecidos, sendo as primeiras células a entrarem em contato com *P. brasiliensis* no organismo hospedeiro. Essas células podem reconhecer e capturar antígenos fúngicos, processando tais antígenos para serem apresentados aos linfócitos T, fato que caracteriza tais células como apresentadoras de antígeno (APCs).

Neste trabalho constatamos que há produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, além de NO, por macrófagos estimulados pela rPCN. Tais citocinas, principalmente IL-12p40, produzidas por macrófagos estimulados com rPCN, podem atuar na geração de resposta imune de padrão Th1, previamente descrita como protetora frente à PCM. Reforçando esses dados, já se conhecia a capacidade da proteína nativa de induzir a produção de TNF- α e NO por macrófagos (COLTRI et al., 2006). Demonstramos agora, que a ativação e indução de citocinas pró-inflamatórias está relacionada com a modulação do perfil dos macrófagos, que são direcionados a partir da interação com rPCN, para a polarização M1, característica de células mais inflamatórias.

Há relatos na literatura de que a ocorrência de uma resposta inflamatória inicial aguda, exacerbada, por parte de macrófagos na infecção por *P. brasiliensis* é prejudicial ao hospedeiro, por ser ineficiente na indução de uma resposta protetora, mediada por linfócitos T (CALICH et al., 2008; PINA et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que macrófagos de camundongos resistentes e susceptíveis diferem quanto a polarização. Macrófagos de camundongos A/J (resistentes) quando estimulados com leveduras de *P. brasiliensis*, têm maior expressão de arginase-1, FIZZ1 e YM1, do que macrófagos de camundongos B10.A (susceptíveis) que, por sua vez, expressam mais iNOS2. Esse padrão de polarização se reflete na secreção de citocinas: macrófagos de camundongos resistentes secretam níveis mais altos de TNF- α , TGF- β , IL-6 e IL-10, enquanto macrófagos de camundongos suscetíveis secretam mais IL-12. Esse quadro confere aos

macrófagos M1 de camundongos suscetíveis maior capacidade de combater o início da infecção por *P. brasiliensis*, não havendo entretanto geração de resposta T satisfatória. Por outro lado, macrófagos M2 de camundongos resistentes não são eficientes na eliminação inicial do fungo, mas geram um perfil de resposta protetora Th1 (PINA et al., 2008; FERIOTTI et al., 2013). A utilização de camundongos Dectina-1^{-/-} permitiu evidenciar-se a importância desse receptor na PCM experimental. Na falta desse receptor, a diferenciação dos macrófagos se dá em direção ao perfil M2 e os camundongos não controlam a doença, o que resulta em maiores mortalidade, destruição tecidual e disseminação fúngica. Por outro lado, os camundongos selvagens modulam macrófagos em direção ao perfil M1 e apresentam um curso mais suave de infecção por *P. brasiliensis* (LOURES et al., 2014).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa indicam que a administração profilática e terapêutica de rPCN a camundongos infectados com *P. brasiliensis*, reverte o quadro de grave injúria tecidual e inflamação descontrolada, além de diminuir a carga fúngica pulmonar dos animais (ALEGRE-MALLER et al., 2014; ALEGRE et al., 2014). Ainda que faltem ensaios *in vivo* que comprovem a real participação de macrófagos M1 no processo de modulação da resposta causado por rPCN, podemos esperar que a participação desses macrófagos seja benéfica para o hospedeiro, ou seja, que o predomínio de macrófagos M1 nos animais tratados com rPCN favoreça a geração de resposta T protetora.

A infecção por *Cryptococcus neoformans* proporciona outro exemplo da importância da diferenciação de macrófagos para o perfil M1. A polarização de macrófagos M1 ocorre via IFN- γ liberado por células Th1; esses macrófagos têm alta capacidade de fagocitar e eliminar o patógeno. Já a geração de macrófagos M2, que se associa à produção de IL-4, não inibe a replicação do fungo. No decorrer da infecção experimental por *C. neoformans* o perfil de macrófagos no pulmão dos camundongos sofre alteração. Eles apresentam perfil M2 durante o período de até duas semanas pós-infecção, fase em que há multiplicação do fungo. Subsequentemente, macrófagos alveolares adquirem perfil mais inflamatório M1, que controla a disseminação do fungo, diminuindo a carga fúngica a níveis próximos ao do inóculo utilizado (DAVIS et al., 2013).

Nosso estudo também revelou haver maior expressão relativa de TLR2 e IL-23 em macrófagos estimulados com rPCN. Como mencionado na introdução, a ativação de macrófagos se acompanha de aumento da mensagem para PRRs, levando à expressão de

receptores funcionais e amplificação da resposta. O aumento da mensagem de IL-23 pode estar relacionado com uma resposta Th17, já que essa citocina é indispensável para a manutenção desse tipo de resposta imune (STRITESKY et al., 2008). Há evidências de que linfócitos Th17 contribuam no combate a infecções fúngicas, como a causada por *Candida albicans* (PANDIYAN et al., 2011; HERNANDEZ-SANTOS et al., 2013).

TLR2 e TLR4 são receptores importantes para o reconhecimento de componentes fúngicos, razão pela qual investigamos se eles reconheceriam rPCN. Ademais, trabalho realizado por nosso grupo havia demonstrado que N-glicanas de TLR2 eram alvo de reconhecimento pelo domínio lectínico de rPCN. Nosso estudo revelou que o envolvimento de TLR4 é destacado, já que a sua ausência resultou em produção baixa ou nula de IL-16, IL-12 e TNF- α frente ao estímulo com rPCN. Além disso, a falta de TLR4 bloqueou a diferenciação de macrófagos para um perfil M1, como verificado em macrófagos de camundongos selvagens. Dessa forma tornou-se claro que TLR4 está implicado nos efeitos de rPCN sobre macrófagos, sugerindo que esse componente fúngico seja um agonista desse PRR. Esses dados reforçam nossas observações anteriores, feitas em sistema de células HEK transfectadas com TLRs, de que rPCN interage com TLR2 e seus dímeros (TLR2/1 e TLR2/6), bem como com TLR4. No caso de TLR2, o estudo foi aprofundado pela disponibilidade de glicomutantes do ectodomínio do receptor: pudemos constatar que a interação era atribuída ao CRD da rPCN, já que a alteração de N-glicanas em TLR2, especialmente da N-glicana que ocupava a quarta posição na sequência proteica, prejudicava a ativação por rPCN (ALEGRE-MALLER et al., 2014).

A importância de TLR2 e TLR4 na PCM vem sendo descrita na literatura. A detecção de menor carga fúngica pulmonar, diminuição de mediadores pró-inflamatórios como IL-12 e NO, menor migração de células inflamatórias para o sítio da infecção e maior frequência de células T reguladoras (Tregs) em camundongos TLR4^{-/-} do que em camundongos selvagens favorece a ideia de que a ausência do receptor aumente a resistência à infecção por *P. brasiliensis*. Entretanto, se apenas a sobrevivência dos camundongos for considerada, a ausência de TLR4 associa-se à menor resistência à infecção (LOURES et al., 2010). Com relação ao papel do receptor TLR2 na patogenia da PCM, tem-se que camundongos TLR2^{-/-}, em comparação a camundongos selvagens, apresentam menor carga fúngica, maior produção de NO, aumento na migração de células polimorfonucleares para o sítio de infecção e elevada secreção de citocinas de perfil Th17. Houve similaridade dos graus de lesões tissulares e

das taxas de mortalidade entre animais selvagens e TLR2^{-/-}. Houve predomínio de resposta Th17 na ausência de TLR2 (LOURES et al., 2009).

Este trabalho desvenda ações exercidas *in vitro* por rPCN sobre macrófagos que correspondem a mecanismos possivelmente implicados no efeito imunomodulador observado *in vivo* na PCM experimental. Postula-se que a rPCN administrada na forma profilática ou terapêutica ao camundongo interaja com TLR4 expressa na superfície de macrófagos residentes, promovendo diferenciação celular para um perfil M1 e alta produção de mediadores inflamatórios (IL-6, TNF- α , IL-12 p40 e NO). Esse macrófago ativado por rPCN pode exercer papel crucial na eliminação do patógeno e na indução de resposta imune protetora mediada por linfócitos Th1.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados podemos concluir que:

- O modelo de expressão heteróloga da PCN em *P. pastoris* é de fácil execução e proporciona bom rendimento.
- A rPCN expressa em *P. pastoris* é purificada em etapa cromatográfica única e reproduz as atividades lectínica e enzimática da proteína nativa.
- O estímulo com rPCN induz macrófagos peritoneais murinos a produzirem IL-12p40, TNF- α , IL-6 e NO.
- O estímulo com rPCN leva macrófagos peritoneais murinos a se diferenciarem em direção ao perfil M1.
- A produção de mediadores inflamatórios estimulada por rPCN é afetada moderadamente pela ausência de TLR2 e drasticamente pela ausência de TLR4, denotando a importância desses receptores na ativação de macrófagos induzida por rPCN.
- A diferenciação de macrófagos peritoneais murinos em direção ao perfil M1 induzida pelo estímulo com rPCN é mediada por TLR4, mas não por TLR2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU E SILVA, M. A.; SALUM, F. G.; FIGUEIREDO, M. A.; CHERUBINI, K. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis--a literature review. **Mycoses**, p. 189-199, 2013.
- ALEGRE-MALLER, A. C.; MENDONÇA, F. C.; DA SILVA, T. A.; OLIVEIRA, A. F.; FREITAS, M. S.; HANNA, E. S.; ALMEIDA, I. C.; GAY, N. J.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of recombinant Paracoccin confers protection against paracoccidioides brasiliensis infection: involvement of TLRs. **PLoS Negl Trop Dis**, p. e3317, 2014.
- ALEGRE, A. C.; OLIVEIRA, A. F.; DOS REIS ALMEIDA, F. B.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; HANNA, E. S. Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against Paracoccidioides brasiliensis infection. **PLoS Negl Trop Dis**, p. e2788, 2014.
- AMANO, K.; TAKASE, M.; ANDO, A.; NAGATA, Y. Production of functional lectin in *Pichia pastoris* directed by cloned cDNA from *Aleuria aurantia*. **Biosci Biotechnol Biochem**, p. 2277-2279, 2003.
- AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, p. 576-580, 2010.
- BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M.; MCEWEN, J. G. Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, p. 197-207, 2008.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, p. 245-252, 1998.
- BARBOSA-LORENZI, V. C.; BURANELLO, P. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; PEREIRA-DA-SILVA, G. The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. **Biochem Biophys Res Commun**, p. 318-324, 2011.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, p. 209-221, 2008.
- BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, p. 248-252, 2001.
- BETHLEM, E. P.; CAPONE, D.; MARANHÃO, B.; CARVALHO, C. R.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis. **Curr Opin Pulm Med**, p. 319-325, 1999.
- BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat Rev Immunol**, p. 33-43, 2006.
- BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu Rev Immunol**, p. 1-21, 2011.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, p. 89-117, 1993.

- BUENTKE, E.;SCHEYNIUS, A. Dendritic cells and fungi. **APMIS**, p. 789-796, 2003.
- BUITRAGO, M. J.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CASTELLI, M. V.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.;CUENCA-ESTRELLA, M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. **J Travel Med**, p. 26-33, 2011.
- CALICH, V. L.; DA COSTA, T. A.; FELONATO, M.; ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; RIBEIRO, L. R.; DE CASSIA VALENTE-FERREIRA, R.;PINA, A. Innate immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection. **Mycopathologia**, p. 223-236, 2008.
- CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; BURGER, E.;CALICH, V. L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, p. 800-806, 1998.
- CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRE, D. C.; VAZ, C. A.; BURGER, E.;CALICH, V. L. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, p. 352-359, 2000.
- CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.;CALICH, V. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect Immun**, p. 1777-1783, 1995.
- CARDOSO, M. R.; MOTA, C. M.; RIBEIRO, D. P.; SANTIAGO, F. M.; CARVALHO, J. V.; ARAUJO, E. C.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MINEO, J. R.;SILVA, D. A. ArtinM, a D-mannose-binding lectin from Artocarpus integrifolia, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against Neospora caninum. **Vaccine**, p. 9183-9193, 2011.
- CAVASSANI, K. A.; TRISTAO, F. S.; OLIVEIRA, L. L.; ROCHA, F. A.; VANCIM, J. O.; MOREIRA, A. P.; CAMPANELLI, A. P.; PANAGIO, L. A.; MILANEZI, C. M.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.;SILVA, J. S. Cell-free antigens from Paracoccidioides brasiliensis drive IL-4 production and increase the severity of paracoccidioidomycosis. **PLoS One**, p. e21423, 2011.
- COLOMBO, A. L.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.;NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol**, p. 785-798, 2011.
- COLTRI, K. C.; CASABONA-FORTUNATO, A. S.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; PINZAN, C. F.; RUAS, L. P.; MARIANO, V. S.; MARTINEZ, R.; ROSA, J. C.; PANUNTO-CASTELO, A.;ROQUE-BARREIRA, M. C. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from Paracoccidioides brasiliensis, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. **Microbes Infect**, p. 704-713, 2006.
- COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.; MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.;ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against Paracoccidioides brasiliensis infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, p. 423-432, 2008.

- COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; RUAS, L. P.; VENDRUSCOLO, P. E.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Med Mycol**, p. 792-799, 2010.
- DAVIS, M. J.; TSANG, T. M.; QIU, Y.; DAYRIT, J. K.; FREIJ, J. B.; HUFFNAGLE, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, p. e00264-00213, 2013.
- DE CASTRO, L. F.; FERREIRA, M. C.; DA SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H.; LONGHI, L. N.; MAMONI, R. L. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **J Infect**, p. 470-485, 2013.
- DOS REIS ALMEIDA, F. B.; DE OLIVEIRA, L. L.; VALLE DE SOUSA, M.; ROQUE BARREIRA, M. C.; HANNA, E. S. Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis*; purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. **Yeast**, p. 67-76, 2010.
- DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J Biol Chem**, p. 9557-9560, 1988.
- FERIOTTI, C.; LOURES, F. V.; FRANK DE ARAUJO, E.; DA COSTA, T. A.; CALICH, V. L. Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. **PLoS One**, p. e54845, 2013.
- FERNANDEZ-FLORES, A.; SAEB-LIMA, M.; ARENAS-GUZMAN, R. Morphological findings of deep cutaneous fungal infections. **Am J Dermatopathol**, p. 531-553; quiz 554-536, 2014.
- FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand J Immunol**, p. 290-297, 2003.
- FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatr Respir Rev**, p. 161-165, 2009.
- FORTES, M. R.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E.; MARQUES, S. A. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, p. 516-524, 2011.
- GANIKO, L.; MARTINS, A. R.; ESPREAFICO, E. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. **Glycoconj J**, p. 527-530, 1998.
- GANIKO, L.; PUCCIA, R.; MARIANO, V. S.; SANT'ANNA, O. A.; FREYMULLER, E.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; TRAVASSOS, L. R. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect**, p. 695-703, 2007.
- GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J Exp Med**, p. 1107-1117, 2003.

- GIMENEZ, M. F.; TAUSK, F.; GIMENEZ, M. M.; GIGLI, I. Langerhans' cells in paracoccidioidomycosis. **Arch Dermatol**, p. 479-481, 1987.
- GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia**, p. 63-70, 1976.
- GREEN, L. C.; RUIZ DE LUZURIAGA, K.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, p. 7764-7768, 1981.
- HEIMO, H.; PALMU, K.; SUOMINEN, I. Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. **Protein Expr Purif**, p. 70-79, 1997.
- HERNANDEZ-SANTOS, N.; HUPPLER, A. R.; PETERSON, A. C.; KHADER, S. A.; MCKENNA, K. C.; GAFFEN, S. L. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Mucosal Immunol**, p. 900-910, 2013.
- IJIMA, N.; AMANO, K.; ANDO, A.; NAGATA, Y. Production of fruiting-body lectins of *Pleurotus cornucopiae* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **J Biosci Bioeng**, p. 416-418, 2003.
- IVORY, C. P.; CHADEE, K. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. **Eur J Immunol**, p. 385-394, 2007.
- KAMEI, K.; SANO, A.; KIKUCHI, K.; MAKIMURA, K.; NIIMI, M.; SUZUKI, K.; UEHARA, Y.; OKABE, N.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. The trend of imported mycoses in Japan. **J Infect Chemother**, p. 16-20, 2003.
- KAMMANADIMINTI, S. J.; MANN, B. J.; DUTIL, L.; CHADEE, K. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. **FASEB J**, p. 155-157, 2004.
- KASHINO, S. S.; FAZIOLI RDOS, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, p. 131-140, 1995.
- KURITA, N.; OARADA, M.; BRUMMER, E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med Mycol**, p. 417-422, 2005.
- KUROKAWA, C. S.; LOPES, C. R.; SUGIZAKI, M. F.; KURAMAE, E. E.; FRANCO, M. F.; PERACOLI, M. T. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, p. 257-262, 2005.
- KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERACOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, p. 125-135, 1998.
- LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol**, p. 750-761, 2011.

- LEE, M. S.;KIM, Y. J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. **Annu Rev Biochem**, p. 447-480, 2007.
- LOURES, F. V.; ARAUJO, E. F.; FERIOTTI, C.; BAZAN, S. B.; COSTA, T. A.; BROWN, G. D.;CALICH, V. L. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+IL-17+ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, p. 762-773, 2014.
- LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAUJO, E. F.; LEITE, K. R.;CALICH, V. L. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun**, p. 1078-1088, 2010.
- LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.;CALICH, V. L. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, p. 1279-1290, 2009.
- LOURES, F. V.; STROEDER, H.; ALMEIDA, I.;CALICH, V. L. Paracoccidioides brasiliensis lipids modulate macrophage activity via Toll-dependent or independent mechanisms. **FEMS Immunol Med Microbiol**, p. 58-70, 2012.
- LUPI, O.; TYRING, S. K.;MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J Am Acad Dermatol**, p. 931-951, quiz 952-934, 2005.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses americanas. **Revista Semanal de Medicina e Cirurgia**, p. 121-124, 1908.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.;HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. **Yeast**, p. 249-270, 2005.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol**, p. 610-615, 2012.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**, p. 700-711, 2013.
- MARTINEZ, F. O.;GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, p. 13, 2014.
- MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P.; DATO, L.; GASSER, B.; SAUER, M.;PORRO, D. Recombinant protein production in yeasts. **Methods Mol Biol**, p. 329-358, 2012.
- MEDNICK, A. J.; FELDMESSER, M.; RIVERA, J.;CASADEVALL, A. Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. **Eur J Immunol**, p. 1744-1753, 2003.
- MELONI-BRUNERI, L. H.; CAMPA, A.; ABDALLA, D. S.; CALICH, V. L.; LENZI, H. L.;BURGER, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of P. brasiliensis after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J Leukoc Biol**, p. 526-533, 1996.
- MOCHIZUKI, S.; HAMATO, N.; HIROSE, M.; MIYANO, K.; OHTANI, W.; KAMEYAMA, S.; KUWAE, S.; TOKUYAMA, T.;OHI, H. Expression and characterization of

- recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, p. 55-65, 2001.
- MORENO, A. N.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **Int Arch Allergy Immunol**, p. 221-230, 2003.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, p. 723-737, 2011.
- NEWORAL, E. P.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R. L.; NORONHA, I. L.; BLOTTA, M. H. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, p. 234-241, 2003.
- NOSANCHUK, J. D.; GACSER, A. Histoplasma capsulatum at the host-pathogen interface. **Microbes Infect**, p. 973-977, 2008.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res**, p. 462-466, 1960.
- OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application - the frutalin case study. **Front Plant Sci**, p. 390, 2014.
- OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIOORDANOU, P. M.; BLOTTA, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, p. 139-144, 2002.
- PAGLIARI, C.; PEREIRA, N. V.; KANASHIRO, L.; STEGUN, F. W.; CRODA, J.; DUARTE, M. I.; SOTTO, M. N. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **J Cutan Pathol**, p. 565-570, 2010.
- PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am J Dermatopathol**, p. 107-112, 2003.
- PANDIYAN, P.; CONTI, H. R.; ZHENG, L.; PETERSON, A. C.; MATHERN, D. R.; HERNANDEZ-SANTOS, N.; EDGERTON, M.; GAFFEN, S. L.; LENARDO, M. J. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. **Immunity**, p. 422-434, 2011.
- PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, J. S. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, p. 1035-1042, 2001.
- PARISE-FORTES, M. R.; MARQUES, S. A.; SOARES, A. M.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E.; PERACOLI, M. T. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. **Br J Dermatol**, p. 643-650, 2006.

- PERACOLI, M. T.; FORTES, M. R.; DA SILVA, M. F.; MONTENEGRO, M. R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, p. 129-136, 1995.
- PEREIRA-DA-SILVA, G.; MORENO, A. N.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim Biophys Acta**, p. 86-94, 2006.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, p. 347-352, 1995.
- PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J Leukoc Biol**, p. 1088-1099, 2008.
- PINA, A.; DE ARAUJO, E. F.; FELONATO, M.; LOURES, F. V.; FERIOTTI, C.; BERNARDINO, S.; BARBUTO, J. A.; CALICH, V. L. Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells. **Infect Immun**, p. 1064-1077, 2013.
- QUEIROZ-TELLES, F.; ESCUISSATO, D. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, p. 764-774, 2011.
- RAMOS-E-SILVA, M.; LIMA, C. M.; SCHECHTMAN, R. C.; TROPE, B. M.; CARNEIRO, S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). **Clin Dermatol**, p. 616-627, 2012.
- RODRIGUES, D. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; CALVI, S. A.; PERACOLI, M. T.; SOARES, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. **Med Mycol**, p. 27-33, 2007.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, p. 1-23, 2004.
- ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Immune regulation and tolerance to fungi in the lungs and skin. **Chem Immunol Allergy**, p. 124-137, 2008.
- RUAS, L. P.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. **Front Microbiol**, p. 218, 2012.
- RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J**, p. 589-613, 2001.
- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, p. 225-242, 2002.
- SANTANA, L. A.; VAINSTEIN, M. H.; TOMAZETT, P. K.; SANTOS-SILVA, L. K.; GOES, A. M.; SCHRANK, A.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M. Distinct chitinases are expressed during various growth phases of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, p. 310-316, 2012.

- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M.; BELTRAMINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J Immunol**, p. 1798-1807, 1994.
- SEGUIN, R.; MANN, B. J.; KELLER, K.; CHADEE, K. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. **Infect Immun**, p. 2522-2527, 1997.
- SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochem Soc Trans**, p. 1457-1460, 2008.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, p. 53R-62R, 2004.
- SINGH, R. S.; BHARI, R.; KAUR, R. Purification, characterization, and mitogenic potential of a mucin-specific mycelial lectin from *Aspergillus sparsus*. **Appl Biochem Biotechnol**, p. 1938-1947, 2015.
- SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, p. 1811-1820, 2000.
- STRITESKY, G. L.; YEH, N.; KAPLAN, M. H. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. **J Immunol**, p. 5948-5955, 2008.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **J Bacteriol**, p. 227-237, 1936.
- TAKEUCHI, T.; TAMURA, M.; ISHII, N.; ISHIKIDA, H.; SUGIMOTO, S.; SUZUKI, D.; NISHIYAMA, K.; TAKAHASHI, H.; NATSUGARI, H.; ARATA, Y. Purification of galectin-1 mutants using an immobilized Galactosebeta1-4Fucose affinity adsorbent. **Protein Expr Purif**, p. 82-86, 2015.
- TEIXEIRA, C. R.; CAVASSANI, K. A.; GOMES, R. B.; TEIXEIRA, M. J.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAVADA, B. S.; DA SILVA, J. S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, p. 3001-3008, 2006.
- VAN DAMME, P. A.; BIERENBROODSPOT, F.; TELGTT, D. S.; KWAKMAN, J. M.; DE WILDE, P. C.; MEIS, J. F. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. **Med Mycol**, p. 13-18, 2006.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; GOW, N. A.; NETEA, M. G. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr Opin Microbiol**, p. 305-312, 2008.
- WILSON, H. M. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. **Front Immunol**, p. 357, 2014.

ANEXO I

Therapeutic Administration of Recombinant Paracoccin Confers Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection: Involvement of TLRs

Ana Claudia Paiva Alegre-Maller¹, Flávia Costa Mendonça¹, Thiago Aparecido da Silva¹, Aline Ferreira Oliveira¹, Mateus Silveira Freitas¹, Ebert Seixas Hanna¹, Igor C. Almeida², Nicholas J. Gay³, Maria Cristina Roque-Barreira^{1*}

1 Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, **2** Border Biomedical Research Center (BBRC), Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, Texas, United States of America, **3** Department of Biochemistry, Cambridge University, Cambridge, United Kingdom

Abstract

Background: Paracoccin (PCN) is an *N*-acetylglucosamine-binding lectin from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Recombinant PCN (rPCN) induces a T helper (Th) 1 immune response when prophylactically administered to BALB/c mice, protecting them against subsequent challenge with *P. brasiliensis*. In this study, we investigated the therapeutic effect of rPCN in experimental paracoccidioidomycosis (PCM) and the mechanism accounting for its beneficial action.

Methodology/Principal Findings: Four distinct regimens of rPCN administration were assayed to identify which was the most protective, relative to vehicle administration. In all rPCN-treated mice, pulmonary granulomas were less numerous and more compact. Moreover, fewer colony-forming units were recovered from the lungs of rPCN-treated mice. Although all therapeutic regimens of rPCN were protective, maximal efficacy was obtained with two subcutaneous injections of 0.5 µg rPCN at 3 and 10 days after infection. The rPCN treatment was also associated with higher pulmonary levels of IL-12, IFN-γ, TNF-α, nitric oxide (NO), and IL-10, without IL-4 augmentation. Encouraged by the pulmonary cytokine profile of treated mice and by the fact that *in vitro* rPCN-stimulated macrophages released high levels of IL-12, we investigated the interaction of rPCN with Toll-like receptors (TLRs). Using a reporter assay in transfected HEK293T cells, we verified that rPCN activated TLR2 and TLR4. The activation occurred independently of TLR2 heterodimerization with TLR1 or TLR6 and did not require the presence of the CD14 or CD36 co-receptors. The interaction between rPCN and TLR2 depended on carbohydrate recognition because it was affected by mutation of the receptor's *N*-glycosylation sites. The fourth TLR2 *N*-glycan was especially critical for the rPCN-TLR2 interaction.

Conclusions/Significance: Based on our results, we propose that PCN acts as a TLR agonist. PCN binds to *N*-glycans on TLRs, triggers regulated Th1 immunity, and exerts a therapeutic effect against *P. brasiliensis* infection.

Citation: Alegre-Maller ACP, Mendonça FC, da Silva TA, Oliveira AF, Freitas MS, et al. (2014) Therapeutic Administration of Recombinant Paracoccin Confers Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection: Involvement of TLRs. PLoS Negl Trop Dis 8(12): e3317. doi:10.1371/journal.pntd.0003317

Editor: Joseph M. Vinetz, University of California, San Diego School of Medicine, United States of America

Received: July 26, 2014; **Accepted:** October 4, 2014; **Published:** December 4, 2014

Copyright: © 2014 Alegre-Maller et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partially funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (grants numbers 2010/01112-9; 2012/20809-6; 2012/09611-0; 2013/14161-6; 2014/05359-0) (www.fapesp.br), by CNPq (grants numbers 306298/2013-9, and 475357/2013-2), and by Programme grant from the UK Medical Research Council (G1000133) to NJG and Wellcome Investigator award to NJG (WT100321/z/12/Z). ICA was partially supported by a grant (#2G12MD007592) from the National Institutes on Minority Health and Health Disparities (NIMHD), a component of the National Institutes of Health (NIH). ICA is a Special Visiting Researcher of the Science Without Borders Program, Brazil. We thank the Biomolecule Analysis Core Facilities at BBRC/UTEP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mcrbarre@fmrp.usp.br, mcrbarre@gmail.com

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), first reported by Adolf Lutz in 1908 in Brazil, is an acute-chronic systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. PCM is autochthonous to Latin America, and its incidence extends from southern Mexico to northern Argentina [1]. Infection is initiated by the

inhalation of airborne propagules, derived from conidia, which transform into pathogenic yeast in the lung [2].

PCM infection can be asymptomatic or give rise to active disease. It causes pulmonary lesions, which lead to significant morbidity, with impairment of lung function. The disease can subsequently disseminate to other organs, producing secondary injuries to the mucosa, skin, lymphoid tissue, and adrenal glands.

Author Summary

Paracoccidioides brasiliensis is a pathogenic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM) in humans, a debilitating fungal infection that mainly affects the lungs and is widespread in Latin America. Paracoccin (PCN) is a sugar-binding protein produced by this fungus. Previous studies have shown that PCN contributes to the colonization of host tissues by the fungus and induces the production of inflammatory factors (i.e., cytokines and nitric oxide) by immune cells such as macrophages. Here we investigated the therapeutic efficacy of recombinant PCN (rPCN) on the course of *P. brasiliensis* infection in mice. Histopathological analysis of lungs of animals treated with rPCN showed much lower inflammation in comparison to untreated, control mice. In addition, fewer infective *P. brasiliensis* yeast forms were recovered from the lung of rPCN-treated animals than from that of control animals. Administration of rPCN was associated with a profile of pro- and anti-inflammatory factors in the lung that was conducive to host protection. These effects were associated with PCN binding to sugar chains linked to innate immunity receptors, namely Toll-like receptors 2 and 4. These findings reveal a mechanism by which rPCN confers protection against PCM.

Acute and sub-acute PCM (juvenile form) develop within weeks to months and cause reticuloendothelial system hypertrophy; they are very severe and frequently mortal. The chronic type (adult form), which accounts for more than 90% of cases, primarily affects the lungs and progresses slowly, taking months to years to develop fully. PCM usually heals by fibrosis, which can permanently interfere with the patient's quality of life. In the absence of effective therapy, PCM can be lethal [3].

The immune response in infected individuals is primarily responsible for the clinical and pathological manifestations of PCM. In patients with active disease, cellular immunity [4], macrophage functions, and differentiation of Th1 cells [5] are often depressed. On the other hand, resistance to fungal infection is linked to the Th1-mediated immune response, which is triggered by the cytokine IL-12. Once secreted, IL-12 stimulates T lymphocytes to release high levels of interferon gamma (IFN- γ) [6–10].

The treatment of systemic mycoses frequently lasts one to two years. Currently, the antifungal drugs of choice are those derived from azole (ketoconazole and itraconazole), administered in association with sulfamethoxazole-trimethoprim, followed by sulfonamides and amphotericin B, for which patient relapse rates are high [11,12]. Immunomodulatory agents able to stimulate balanced Th1 immunity can increase the efficacy of antifungals in experimental mycosis [13]. ArtinM, a D-mannose binding lectin, has immunomodulatory properties that protect against *P. brasiliensis* infection. Prophylactic and therapeutic protocols of ArtinM administration promote a Th1 immune response balanced by IL-10 [14]. A few studies have investigated the protective effect of antigens from the fungus itself, which are capable of inducing an effective cellular immune response and host protection [15–17]. Irradiated yeast cells confer long lasting protection in BALB/c mice, with a significant reduction in fungal burden in the lung, spleen, and liver [18]. Vaccination with a plasmid encoding the gp43-derived P10 peptide reduced fungal burden in the lung. Co-vaccination with a plasmid encoding mouse IL-12 yielded the best results in elimination of the fungus, with virtual sterilization at

Table 1. Therapeutic groups.

Groups	rPCN administration (days post-infection)
Control ^a	3, 10, and 17
G1	3, 10, and 17
G2	3 and 10
G3	10
G4	3

^aPBS alone.

doi:10.1371/journal.pntd.0003317.t001

long-term infection. The immunization induced the production of IL-12 and IFN- γ [19].

Our group has shown that the recombinant form of paracoccin (rPCN) induces a Th1 protective response during PCM when prophylactically administered to mice [20]. Herein, we determined whether therapeutic administration of rPCN modified the course of experimental PCM. rPCN treatment drastically reduced pulmonary lesions and fungal burden and increased the pulmonary levels of Th1 cytokines and IL-10. Furthermore, stimulation of murine macrophages with rPCN induced IL-12 production, in a Toll-like receptor (TLR) 2- and 4-dependent manner, through recognition of TLR N-glycans by the rPCN carbohydrate-recognition domain (CRD).

Materials and Methods

Ethics statement

All *in vivo* experiments were approved by the Ethical Committee for Ethics in Animal Research (CETEA) of the School of Medicine at Ribeirão Preto, University of São Paulo. All efforts were made to minimize suffering, and the animal experiments were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) (Protocol 20/2013-1).

Mice and the *P. brasiliensis* strain

Male BALB/c and C57BL/6 mice were used at 6–8 weeks of age. They were acquired from the vivarium on the campus of University of São Paulo at Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, and housed in the animal facility of the Molecular and Cellular Biology Department, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Mice were maintained under optimized hygienic conditions.

The *P. brasiliensis* isolate, Pb18, was used to infect mice. The virulence of Pb18 yeast cells was maintained by periodic passages in mice, with subsequent recovery on brain-heart infusion (BHI) agar. Before experimental infection, yeast forms were grown in liquid BHI medium (HiMedia, Mumbai, India) for 3–7 days at 37°C with gentle agitation. Fungal cells were washed in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and counted in a Neubauer chamber. The viability of the yeast cells was determined by fluorescein diacetate and ethidium bromide staining [21]. Viability was always higher than 90%. Each experimental group consisted of five mice, and the assays were performed in triplicate.

Purification of recombinant paracoccin (rPCN)

Recombinant paracoccin was expressed in *Escherichia coli*, as previously described [20]. It was purified by affinity chromatography on an N-acetylglucosamine column. Before use, endotoxins were removed with an immobilized polymyxin B agarose column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's

Figure 1. Lung histopathology of *P. brasiliensis*-infected mice treated with rPCN. The panels show representative lung sections from mice that were not infected (A); infected and not treated (B); or infected and therapeutically treated according to different protocols (C–F). The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (panels G–L) or with Gomori's methenamine silver (GMS) (panels M–R). Images were captured using a Carl Zeiss Axiophot microscope coupled to a JVC TK1270 camera. Magnification bars = 500 μ m for total lung and 200 μ m for lung sections. doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g001

instructions. rPCN was then resuspended in endotoxin-free PBS (sterile PBS). For *in vitro* assays, rPCN aliquots were incubated for 1 h at room temperature (RT) with polymyxin (50 μ g/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to neutralize any potential contamination with bacterial lipopolysaccharides (LPS). rPCN preparations contained less than 0.05 ng/mL of bacterial endotoxin, as determined by the Endpoint Chromogenic LAL assay kit (Walkersville, Maryland, USA).

Infection of mice and rPCN administration

BALB/c mice were infected with *P. brasiliensis* (1×10^6 yeast in 100 μ L PBS) by intravenous injection (i.v.) through the ophthalmic

plexus. Uninfected control mice were inoculated with 100 μ L PBS alone, under the same conditions as the infected group. After infection, mice were treated subcutaneously (s.c.) with rPCN (0.5 μ g in 100 μ L PBS). The treatment with rPCN was standardized according to number of administrations (1–3 doses). rPCN was administered as described in Table 1, after infection with *P. brasiliensis*. The course of infection was evaluated 30 days post-infection. In all experiments, the PBS used was sterile and endotoxin-free.

Histopathological analysis of the lung

Mice were euthanized 30 days post-infection. The lungs were excised, fixed in 10% formaldehyde for 24 h, dehydrated in ethanol,

Figure 2. Morphometry of lung granulomas and analysis of fungal burden in infected animals treated with rPCN. Each group of mice was either not treated (PBS) or therapeutically treated according to protocols G1–G4 (see Material and Methods). Panel A: Number of granulomas per mm² of tissue. Panel B: Granuloma area, in µm². Panel C: Pulmonary CFU recovery. For morphometric analysis, the Image J program, developed by Wayne Rasband of the National Institute of Mental Health, was used. Bars depict the mean and SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. the PBS group.

doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g002

diaphanized in xylene, and embedded in paraffin. Histological sections were cut to a thickness of 5 µm and stained with hematoxylin-eosin. For morphometric and histological analysis, images were acquired at a magnification of 20× using a light microscope (Axiophot Photomicroscope; Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) with a camera (JVC TK-1270; Victor Company of Japan Ltd., Tokyo, Japan). Tissue and granuloma areas were determined using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), and the density was calculated as the ratio of the number of granulomas to tissue area (granulomas/mm²) in each section/mouse (6 mice per group). The total granuloma area (µm²) was determined by Σ area of sections/group. For visualization of the fungus in the granulomas, the tissue sections were stained with Gomori's methenamine silver.

Fungal burden in the lungs of infected mice

Mice were euthanized 30 days post-infection and fungal burden was measured by colony-forming units (CFU). One lobe of the lung was aseptically removed from each animal, weighed, and homogenized in 1.0 mL sterile PBS using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25 Basic; IKA Works, Inc., Wilmington, DE, USA). The final suspension (100 µL/Petri dish) was placed on solid BHI medium supplemented with 4% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen, Life Technologies, Camarillo, CA, USA). Gentamycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) was added at 96 µg/mL. Petri dishes were incubated at 37°C for 7–14 days, and colonies were counted (1 colony = 1 CFU). The results indicated the number of viable *P. brasiliensis* colonies per gram of organ. They were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) and were representative of duplicate samples.

Cytokine measurement

Lung homogenates were centrifuged at 2000× *g* for 15 min, at 4°C. The supernatants were collected and stored at −20°C. These samples were used to measure the levels of IL-12p40, IL-4, IL-10, tumor necrosis factor (TNF-α), and IFN-γ. The cytokines were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an OptEIA kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA), according to manufacturer's instructions. Murine recombinant cytokines were used to create standard curves, and cytokine concentrations were determined with reference to the standard curves. The absorbance was read at 450 nm in a microplate scanning spectrophotometer (Power Wave-X; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The results were expressed in pg/mL.

Nitric oxide production

Nitric oxide (NO) production was quantified in the lung supernatants using the standard Griess reaction [22]. Briefly, fifty

microliters of supernatant from the lung homogenates were distributed in 96-well microplates and incubated with 50 µL/well of Griess reagent (1.0% sulfanilamide, 0.1% naphthalenediamine dihydrochloride, and 2.5% H₃PO₄) at RT for 10 min. The absorbance at 550 nm was determined using a microplate reader. The absorbance was converted to micromolar (µM) NO with reference to a standard curve, generated using defined concentrations of NaNO₂. All results were expressed in µM and are representative of triplicate experiments.

Production of IL-12 by murine macrophages

C57BL/6 mice were i.p. injected with 2.0 mL sterile 3% sodium thioglycollate (Sigma-Aldrich). After 4 days, the animals were sacrificed, and their peritoneal cells were recovered by washing the cavity with 5.0 mL sterile PBS. The cell suspension was centrifuged at 300× *g* for 10 min and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). Cells were plated in a 48-well culture plates (5 × 10⁵ cells/well) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere overnight. Non-adherent cells were removed by washing in sterile PBS, and adherent cells were incubated in DMEM+10% FBS medium containing rPCN (2.5 µg/mL or 5.0 µg/mL). After 24-, 48-, and 72-h incubation periods, culture supernatants were harvested, and IL-12p40 levels were assessed by capture ELISA.

Cell culture and transfection with TLR receptors, co-receptors, and TLR2 N-glycosylation mutants

Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS at 37°C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. Cells were plated in 12-wells plates (5 × 10⁵ cells/well). After overnight incubation, cells (approximately 80% confluent) were transiently cotransfected with CD14, CD36, MD-2, and a combination of TLRs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as previously described [23]. The total amount of DNA per well was normalized to 2 µg by adding empty vector. All plasmids used for transfection were purified with the EndoFree plasmid kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). After 24 h, the cells were transferred to 96-wells plates (4 × 10⁴ cells/well). Human TLR2 N-glycosylation mutant plasmids were generated as described by Weber et al. [24]. For transfection with these TLR2 mutants, HEK293T cells were plated in 96-wells plates (3.5 × 10⁴ cells/well). After 24 h, they were transiently transfected with constructs encoding TLR2 wild-type or mutant proteins. After overnight incubation, cells were stimulated

Figure 3. Therapeutic administration of rPCN increases proinflammatory cytokine and NO production. Lung homogenates were analyzed for IL-12p40 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-10 (D), IL-4 (E), and NO (F) concentrations. Data represent the mean and SD of five mice per group; the experiments were performed in triplicate. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. the PBS group. doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g003

for 20 h with the following positive controls: Pam3CysK4 (P3CSK4; EMC Microcollections, Tübingen, Germany) for TLR2/1, fibroblast stimulating ligand-1 (FSL-1; EMC Microcollections) for TLR2/6, and LPS-EB Ultrapure (standard LPS, *E. coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for TLR4, or with the negative control for cell stimulation (medium). Concentrations of 1.25 μ g/mL or 5.0 μ g/mL of rPCN were assayed. Cells transfected with empty vector, incubated with either medium or agonists (FSL-1 or P3C), were also assayed; negative results were required for including each system in this study. IL-8 was detected in the culture supernatants, using the OptEIA Human IL-8 ELISA

kit (BD Biosciences). The results represent the mean $\pm$ SD, and the values are representative of triplicate experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis of the differences between the means of the experimental groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All *in vivo* and *in vitro* experiments are representative of three independent assays, for which five animals were included per group. Differences with p < 0.05 were considered statistically significant.

Figure 4. rPCN induces the *in vitro* production of IL-12p40 by murine macrophages. Cells were harvested from the peritoneal cavity of C57BL/6 mice stimulated with thioglycollate. Adherent cells were incubated with rPCN (2.5 μg/mL or 5.0 μg/mL) for 24, 48, and 72 h. Medium was used as a negative control; LPS+IFN-γ was used as a positive control. Tests were performed in triplicate. The statistical comparison was done between cells incubated with medium (negative control), cells stimulated with LPS+IFN-γ, and cells stimulated with rPCN (2.5 μg/mL and 5.0 μg/mL) for corresponding times. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. The levels of IL-12 induced by rPCN were significantly lower when compared to the positive control, except after 72 h of incubation under the stimulus of 5.0 μg/mL rPCN; the levels of IL-12 induced by rPCN were significantly higher than that verified by the negative control; and, the IL-12 production was significantly higher when the cells were stimulated with 5.0 μg/mL rPCN in comparison with 2.5 μg/mL rPCN. The results were considered significant when $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***). doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g004

Results

Effect of therapeutic rPCN administration on pulmonary fungal load and histopathology

We first evaluated whether therapeutic administration of rPCN interfered with the course of PCM in a murine model, as previously reported for the prophylactic administration of rPCN [20]. Groups of BALB/c mice were i.v. infected with *P. brasiliensis* yeast and then submitted to different protocols of subcutaneous rPCN administration, which varied according to the number and timing of injections (see Table 1, Materials and Methods).

Histopathological examination of the lung sections showed that organ architecture was preserved in rPCN-treated mice, with a few compact, individualized, and well-organized granulomas present, regardless of the administration regimen (Fig. 1C–F and 1I–L). On the other hand, severe lesions, characterized by a diffuse inflammatory reaction with several multifocal and coalescent granulomas, were observed in the lungs of untreated, control mice, which received only vehicle (PBS) (Fig. 1B and 1H). Morphometric analysis demonstrated that the number of granulomas in the lungs of rPCN-treated mice was lower than that in the lungs of the control mice (Fig. 2A). The granuloma density was 0.79, 0.53, 0.48, and 0.58 granulomas/mm² of tissue for groups 1, 2, 3, and 4, respectively, compared with 2 granulomas/mm² in the pulmonary tissue of control mice. This represents a difference of at least 60% between the number of granulomas present in the lungs of rPCN-treated mice and control mice. In addition, the total area occupied by granulomas in mice treated with rPCN on days 3, 10, and 17 post-infection (G1), on days 10 and 17 post-infection (G2), and day 10 post-infection (G3) was 2.8-, 1.8-, and 2.2-fold lower than the total area occupied by granulomas in control animals (Fig. 2B). Moreover, silver-stained sections showed that the number of yeast inside the granulomas was much larger in control mice than in rPCN-treated mice (Fig. 1N–R), suggesting that rPCN contributes to the control of fungal infection. The histopathology results were reinforced by the fungal burden analysis. CFU recovered from the lungs 30 days post-infection were significantly higher in the untreated control group than in the rPCN-treated groups: the pulmonary fungal burden was at least 50% lower in the treated groups (Fig. 2C). Taken together, our results demonstrate that therapeutic administration of rPCN is associated with the development of an appropriate inflammatory reaction and with the control of fungal burden, regardless of the inoculation regimen.

Therapeutic rPCN administration augments the pulmonary levels of inflammatory mediators

Because therapeutic rPCN administration protected against *P. brasiliensis* infection, we investigated the immune response profile of treated mice. Thirty days after infection, cytokine and NO levels in lung homogenates from treated mice and control mice were assessed. The highest levels of IL-12p40 (Fig. 3A) and IFN-γ (Fig. 3B) were detected in groups 2 and 3. Although modestly increased, IFN-γ levels in group 1 were significantly higher than

Figure 5. rPCN triggers TLR-mediated cell activation. HEK293T cells were transfected with CD14 and CD36 along with TLR2/1 (A), TLR2/6 (B), or TLR4 (C). The total amount of DNA in each transfection was kept constant by adding empty expression vector. The cells were stimulated with the indicated concentrations of rPCN, previously incubated with polymyxin to neutralize LPS, at 37°C for 20 h. The agonists used as positive controls were: Pam3CysSK4 (P3C) for TLR2/1, fibroblast stimulating ligand-1 (FSL-1) for TLR2/6, and bacterial lipopolysaccharide (LPS) for TLR4. Medium was used as negative control for cell stimulation (white bars). The cell supernatants were analyzed for IL-8 by ELISA. Statistical differences were determined by comparing transfected cells stimulated with rPCN to transfected cells incubated with medium. The results were considered significant when $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***). doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g005

Figure 6. TLR2 heterodimerization is not critical for the cell activation triggered by rPCN. HEK293T cells were transfected with CD14 and CD36 along with TLR2, TLR2/TLR1 or TLR2/TLR6. The total amount of DNA in each transfection was kept constant by adding empty expression vector. After 48 h of transfection, cells were stimulated with the agonists: Pam3CysSK4 (P3C) for TLR2/1 and FSL-1 for TLR2/6. Medium was used as negative control for cell stimulation (white bars). rPCN (1.25 μ g/mL), previously incubated with polymyxin to neutralize LPS, was assayed. The cell supernatants were analyzed for IL-8 by ELISA. Panel A: Cells transfected with TLR2 and TLR1. Panel B: Cells transfected with TLR2 and TLR6. Results are representative of five independent experiments. Statistical differences were assessed by comparing the response of cells expressing TLR2 to the response of cells expressing TLR2/TLR1 or TLR2/TLR6. Values are the mean $\pm$ S.D. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g006

those in control mice. The production of TNF- α (Fig. 3C), IL-10 (Fig. 3D), and IL-4 (Fig. 3E) was similar among the groups. Only groups 2 and 4 produced higher concentrations of IL-10 and TNF- α , respectively. In accordance with the observed inflammatory profile, NO levels in the lung homogenates of groups 2, 3, and 4 mice were higher than those of the untreated control mice (Fig. 3F). These results indicate that the protection against *P. brasiliensis* infection, conferred by therapeutic administration of rPCN, is associated with the development of Th1 immunity, as previously reported for prophylactic administration of rPCN [20].

rPCN stimulates *in vitro* IL-12 production by murine peritoneal macrophages

Because rPCN administration led to the development of Th1 protective immunity in mice infected with *P. brasiliensis*, we examined IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages stimulated with 2.5 or 5.0 μ g/mL rPCN for 24, 48, and 72 h. Figure 4 shows that both concentrations of the lectin were able to induce the production of higher levels of IL-12 than the negative control. However, 5.0 μ g/mL rPCN was more effective than 2.5 μ g/mL rPCN in inducing this production. After 72 hours of incubation, the IL-12 levels induced by 5.0 μ g/mL rPCN were similar to those induced by the positive control stimulus (LPS plus IFN- γ). On the other hand, the levels of IL-12 induced by 2.5 μ g/

mL rPCN were lower than that induced by the positive control, regardless of the incubation period. We hypothesized that the augmented production of IL-12 by macrophages could account for the Th1 protective response induced by rPCN *in vivo*, in which IFN- γ and TNF- α production conferred protection against PCM.

rPCN triggers TLR activation

IL-12 production by phagocytes is often initiated by the interaction of TLRs on the cell surface with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Therefore, we next evaluated whether rPCN induced the activation of TLR4 and TLR2. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding TLR2 heterodimers (TLR 2/1 or TLR2/6) or TLR4, and stimulated for 20 h with several concentrations of rPCN or with the appropriate TLR agonist (positive controls). Cell activation was assessed by measuring IL-8 levels in the culture supernatants by ELISA. rPCN triggered IL-8 production in TLR2/1 (Fig. 5A), TLR2/6 (Fig. 5B), and TLR4 (Fig. 5C) transfected cells. In all cases, rPCN at concentrations as low as 1.25 μ g/mL was sufficient to trigger similar or higher responses than those induced by the control agonists. As shown in Figure 6, cells transfected with TLR2 alone decreased the IL-8 production in response to rPCN stimulus by 16% in the absence of TLR1 and 24% in the absence of TLR6. Thus, although rPCN interacted with homodimeric TLR2,

Figure 7. The absence of either CD14 or CD36 does not affect the TLR activation triggered by rPCN. HEK293T were cotransfected with CD14 and/or CD36 along with TLR2/1 (A) or TLR2/6 (B). The total amount of DNA in each transfection was kept constant by adding empty expression vector. The HEK293T cells were stimulated with rPCN (1.25 μ g/mL), which was previously incubated with polymyxin to neutralize LPS. The positive controls were Pam3CysSK4 (P3C) for TLR2/1 and FSL-1 for TLR2/6. Medium was used as negative control for cell stimulation (white bars). Results are representative of three independent experiments. Statistical differences were assessed by comparing the response of cells lacking one of the co-receptors to the response of cells expressing both co-receptors, under similar stimuli. Values are the mean $\pm$ S.D. *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g007

Figure 8. Reduction of r-PCN-induced activation of mammalian cells transfected with TLR2 glycosylation mutants. HEK293T cells expressing full-glycosylated TLR2 (WT – A6) or mutants of the N-glycosylation sites were stimulated with rPCN. The total amount of DNA in each transfection was kept constant by adding empty expression vector. Reduced activation was detected by comparing the IL-8 levels produced by HEK293T cells expressing a certain TLR2 mutant with that produced by cells transfected with the full glycosylated TLR2. FSL-1 was used as a positive control. Medium supplemented with polymyxin (white bars) was used as negative control for cell stimulation. The E6 mutant was used as a negative control of the assay. For each transfected TLR2 ectodomain, the mutated site(s) [lacking N-glycans] is (are) represented by traces in red, while the preserved N-glycans are in black. Results are representative of two independent experiments. Values are mean $\pm$ S.D. The statistical comparison was done between HEK293T cells expressing full-glycosylated TLR2 (WT – A6) and the mutants of the N-glycosylation sites, stimulated with rPCN. The results were considered significant when $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***). doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g008

heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 modestly enhanced cell activation. Otherwise, in the absence of CD14 or CD36 co-transfection, the response of TLR2/TLR1- or TLR2/TLR6-transfected cells to rPCN was not reduced. This finding shows that TLR activation by rPCN is not affected by the absence of either CD14 or CD36 co-receptors (Fig. 7). These data suggest a mechanism by which rPCN protects animals during PCM.

rPCN targets TLR2 through carbohydrate recognition

Because rPCN has a CRD able to bind GlcNAc, and TLR2 has four N-glycosylation sites in its ectodomain, we investigated whether the rPCN targeted the N-glycans on TLR2. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding wild-type TLR2 or TLR2 mutants lacking one or more N-glycosylation sites [24]. Cells expressing wild-type or mutated TLR2 were incubated with rPCN for 20 h, and the levels of IL-8 in the culture supernatants were assessed. The level of IL-8 produced by cells transfected with the full-glycosylated TLR2, under rPCN stimulus, was compared with the levels produced by cells transfected with glycosylation mutants of TLR2 (B6, B8, C6, D7, A8, D6, and E6). The results are shown in Figure 8 as the IL-8 concentration in the supernatant of transfected cells. All these transfected cells, with exception of the E6 mutant, were responsive to the TLR2 agonist FSL-1, used as positive control. Medium, used as negative control, did not induce cell activation. The TLR2 mutants A8 (lacking the second and fourth N-glycans), D7 (lacking the third and fourth N-glycans), B6 (lacking the first N-glycans), B8 (lacking the fourth N-glycans), and E6 (lacking all four N-glycans) were associated with a significant decrease in the IL-8 production induced by rPCN, relative to the IL-8 production by cells expressing the wild-type TLR2 ectodomain (Fig. 8). The fourth N-glycan appears to be a critical target for rPCN CRD, once its presence, even in the absence of the three other N-glycans (D6 mutant), was sufficient to mediate rPCN-induced IL-8 production, at levels similar to those observed in cells expressing fully glycosylated TLR2.

Although E6 did not respond to the agonist (FSL-1), it worked as an appropriate negative control for the assay, once it was previously demonstrated that TLR2 lacking all four N-glycans is not secreted by the HEK cells (Weber, 2004).

Discussion

Dramatic increases in the incidence of human fungal diseases worldwide as well as the toxicity and limited efficacy of anti-fungal drugs, especially without the help of host immune reactivity, require the development of new strategies for confronting fungal infections. Immunomodulation strategies are thought to hold promise. Their design entails a deep understanding of fungal interaction with various innate immune receptors [13], a necessity that became more obvious by the finding that an anti-fungal agent (amphotericin B) needs TLRs for efficacy [25]. Some exogenous lectins exert immunomodulatory effects in mammals by interacting with host-cell glycans [26–28], a fact that opens new perspectives in the design of strategies to control infectious diseases. ArtinM is the most studied immunomodulatory exogenous substance acting through carbohydrate recognition on cells of innate [23,29–40] and adaptive [41] cells. Its effects favor host resistance against diseases caused by several pathogens [31,36,42,43], including *P. brasiliensis* [14,34,44]. Nonetheless, as a plant lectin, ArtinM itself has restricted application in the prophylaxis or therapy of human diseases. On the other hand, paracoccin, as a lectin constituent of *P. brasiliensis*, the causal agent of PCM, could be potentially used for therapy against this endemic fungal disease in Latin America. This perspective has motivated us to characterize PCN effects in the course of PCM and elucidate the mechanisms that account for its property of inducing host Th1 immunity. This was discovered by administering PCN prophylactically to mice prior to be infected with *P. brasiliensis* yeasts. Remarkably, they became resistant to the infection, a fact that was attributed to the augmented pulmonary levels of pro-inflammatory mediators [20]. PCN was shown herein to be efficient also as a therapy against the ongoing mycosis, and

Figure 9. Possible mechanism of the protection against murine paracoccidioidomycosis conferred by paracoccin administration, as suggested by *in vivo* and *in vitro* studies. Once administered to BALB/c mice, before or after inoculation of *P. brasiliensis* yeasts, rPCN interacts with N-glycans of TLRs on antigen-presenting cells (APC). It triggers IL-12 production, which drives immunity to the Th1 axis. Production of IL-10 is also induced. The consequent balanced Th1 immunity that is developed protects mice against PCM, as manifested by lower incidence of granulomatous lesions and more efficient fungal clearance in the lungs, at day 30 post-infection.
doi:10.1371/journal.pntd.0003317.g009

the observed Th1 immunity was attributed to PCN interaction with N-glycans of TLR2 and TLR4.

The initial studies on PCN were performed by using a fraction obtained from *P. brasiliensis* yeast extracts, enriched by affinity chromatography onto D-GlcNAc-agarose columns. Since this D-GlcNAc-binding fraction stimulated the release of TNF- α and NO by murine macrophages [45], an immunomodulatory activity was conjectured for PCN. More recently, the availability of recombinant paracoccin has made possible the experimental validation of the original hypothesis. Our previous work that associated rPCN administration with Th1 immunity [20] is confirmed here, and is consistent with the fact that a mild or sub-clinical PCM infection, observed in resistant hosts, is linked to the release of Th1 cytokines by a subset of CD4⁺ T cells, such as IFN- γ and TNF- α [46–49]. Notably, rPCN administration on the days 3 and 10 after infection enhanced both Th1 immunity and IL-10 production. The mechanism by which IL-10 might work in this model of infection is discussed below.

The development of Th1 lymphocytes depends on stimulation by IL-12 [49], a cytokine that is mainly derived from activated cells of the innate immune system [50]. In the present study, we verified that rPCN stimulates murine macrophages to augment IL-12 production, a finding that led us to hypothesize that like Artin M [24], rPCN can interact with TLRs on the macrophage surface. This hypothesis was confirmed by signaling assays in HEK293T cells transfected with TLR2 or TLR4, in which rPCN caused TLR-mediated cell activation, as manifested by augmentation of IL-8 production [51,52]. Most TLR2 agonists are recognized by receptor heterodimers, formed by association of TLR2 with TLR1 or TLR6 [50–52]. In addition, the participation of co-receptors is often required for efficient activation. Using the same cell-based assay, we show that rPCN could trigger TLR2 activation independently of heterodimerization, and that the cell response does not require CD14 or CD36 to be stimulated. The hypothesis that rPCN interacted with N-linked glycans of the TLR ectodomain was validated by using, specifically, HEK293T cells

transfected with TLR2 mutants, in which the N-glycosylation sites were successively disrupted [24]. This system has revealed that the TLR2-rPCN interaction was dependent on carbohydrate recognition and that the fourth TLR2 N-glycan was critical for establishing the interaction and triggering cell activation. It was previously reported that the N-glycosylation status is essential for secretion and function of TLRs, including TLR2 [24] and TLR4 [53], a fact that is consistent with the high degree of conservation of TLR N-glycosylation sites between species [24]. Concerning TLR2, Weber et al. (2004) [24] reported that monoglycosylated and diglycosylated mutants do not support secretion. Intriguingly, our data indicate that rPCN, as well as positive control agonist FSL1, triggers activation of HEK293T cells expressing some mono- (D6) and diglycosylated (A8, D7, and C6) TLR2 mutants. Our group obtained similar results when studying the recognition of TLR2 N-glycans by the lectins rTgMIC1 e rTgMIC4 of *Toxoplasma gondii*, which also activated HEK293T cells expressing mono- and diglycosylated mutants (unpublished data).

The production of Th1 cytokines and the concomitant increase in the pulmonary levels of IL-10 following the rPCN administration can be explained by TLR pathway activation. Inflammatory signaling by TLRs results in the downstream activation of NF- κ B, IFN regulatory factors (IRFs), and MAPKs. In addition, ITAM signaling and IFN- γ , whose production is highly augmented in mice treated with rPCN, cooperate with the crosstalking among the macrophage activation pathways favoring a balance between pro- and anti-inflammatory cytokines, with IL-10 and Stat3 involved in TLR-induced feedback inhibition. The mechanism involves GSK3, AP-1, CREB, and Akt as major regulators of the TLR2-induced feedback-inhibition loop, with IFN- γ suppressing this mechanism [54]. Ultimately, the balance in cytokine production would prevent severe immunopathology that could

occur in response to rPCN administration, a distinctive feature of the protective effect of rPCN against *P. brasiliensis* infection.

Our results and assumptions allow us to delineate a sequence of events that can constitute the mechanism of rPCN effects *in vivo* (Figure 9). Once administered to mice, rPCN interacts with TLRs, induces IL-12 production, thereby driving immunity to the Th1 axis, with a balanced bias due to concomitant production of IL-10, and modification of the course of experimental PCM.

In conclusion, our study demonstrates that therapy with recombinant paracoccin provides resistance against *P. brasiliensis* infection by inducing balanced Th1 immunity, which is triggered by the lectin interaction with TLR2 N-glycans. Moreover, it addresses the challenge of identifying fungal antigens that can induce optimal immune responses *in vivo* by targeting innate immunity receptors on antigen presenting cells. Therefore, paracoccin may have its use as an appropriate immunotherapy for paracoccidioidomycosis.

Acknowledgments

We are grateful to Mrs. Sandra M. O. Thomaz and Vani M. A. Correa for technical assistance and Luciana Pereira Ruas for helpful intellectual discussions. The histological morphometric analysis was performed in the Laboratory of Applied and Experimental Neurology of the Medical School of Ribeirao Preto, USP.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACPAM FCM ESH ICA NJG MCRB. Performed the experiments: ACPAM FCM TAdS MSF. Analyzed the data: ACPAM FCM TAdS MSF AFO ESH ICA NJG MCRB. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACPAM ESH ICA NJG MCRB. Wrote the paper: ACPAM MSF TAdS AFO ICA NJG MCRB.

References

- Marques SA (2012) Paracoccidioidomycosis. Clin Dermatol 30: 610–615.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev 6: 89–117.
- Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol 10: 80–87.
- Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, et al. (2001) Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. Cytokine 13: 248–252.
- Calich VL, Kashino SS (1998) Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz J Med Biol Res 31: 615–623.
- Calich VL, Vaz CA, Burger E (1998) Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Res Immunol 149: 407–417; discussion 499–500.
- Cano LE, Kashino SS, Arruda C, Andre D, Xidieh CF, et al. (1998) Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect Immun 66: 800–806.
- Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, et al. (2003) Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes Infect 5: 413–418.
- Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, et al. (2000) Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am J Pathol 156: 1811–1820.
- Livonesi MC, Souto JT, Campanelli AP, Maffei CM, Martinez R, et al. (2008) Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. Med Mycol 46: 637–646.
- Graybill JR, Tollemar J, Torres-Rodriguez JM, Walsh TJ, Roldiles E, et al. (2000) Antifungal compounds: controversies, queries and conclusions. Med Mycol 38 Suppl 1: 323–333.
- Gubbins PO, Amsden JR (2005) Drug-drug interactions of antifungal agents and implications for patient care. Expert Opin Pharmacother 6: 2231–2243.
- Romani L (2004) Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol 4: 1–23.
- Ruas LP, Carvalho FC, Roque-Barreira MC (2012) ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. Front Microbiol 3: 218.
- Reis BS, Fernandes VC, Martins EM, Serakides R, Goes AM (2008) Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. Vaccine 26: 5461–5469.
- Fernandes VC, Martins EM, Boeloni JN, Coitinho JB, Serakides R, et al. (2011) The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. Microbes Infect 13: 1062–1072.
- Travassos LR, Taborda CP (2012) Paracoccidioidomycosis vaccine. Hum Vaccin Immunother 8: 1450–1453.
- do Nascimento Martins EM, Reis BS, Fernandes VC, Costa MM, Goes AM, et al. (2007) Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* induces a long lasting protection in BALB/c mice. Vaccine 25: 7893–7899.
- Rittner GM, Munoz JE, Marques AF, Nosanchuk JD, Taborda CP, et al. (2012) Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. PLoS Negl Trop Dis 6: e1519.
- Alegre AC, Oliveira AF, Dos Reis Almeida FB, Roque-Barreira MC, Hanna ES (2014) Recombinant paracoccin reproduces the biological properties of the native protein and induces protective Th1 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. PLoS Negl Trop Dis 8: e2788.
- Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD (1979) The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. Clin Immunol Immunopathol 12: 21–30.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem 126: 131–138.
- Mariano VS, Zorretto-Fernandes AL, da Silva TA, Ruas LP, Nohara LL, et al. (2014) Recognition of TLR2 N-Glycans: Critical Role in ArtinM Immunomodulatory Activity. PLoS One 9: e98512.
- Weber AN, Morse MA, Gay NJ (2004) Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. The Journal of biological chemistry 279: 34589–34594.
- Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, et al. (2003) The antifungal drug amphoterin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. J Biol Chem 278: 37561–37568.
- Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC (2013) The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. Glycoconj J 10.1007/s10719-012-9464-4.
- Unit J, Hornigold D (2011) Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. Biochem Pharmacol 81: 1324–1328.
- da Silva LC, Correia MT (2014) Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. Front Microbiol 5: 20.

29. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, Beltrami LM, Roque-Barreira MC (1994) A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol* 153: 1798–1807.
30. Ganiko L, Martins AR, Espreafico EM, Roque-Barreira MC (1998) Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconj J* 15: 527–530.
31. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS (2001) KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 11: 1035–1042.
32. Ganiko L, Martins AR, Freymuller E, Mortara RA, Roque-Barreira MC (2005) Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta* 1721: 152–163.
33. Pereira-da-Silva G, Moreno AN, Marques F, Oliver C, Jamur MC, et al. (2006) Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. *Biochim Biophys Acta* 1760: 86–94.
34. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, et al. (2008) Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol* 173: 423–432.
35. Sakamoto M, Dias-Baruffi M, Santos-de-Oliveira R, Cunha FQ, Roque-Barreira MC (1998) An intravascular chemoattractant lectin inhibits neutrophil migration. *Glycoconj J* 15: 531–533.
36. Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, Teixeira MJ, Roque-Barreira MC, et al. (2006) Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 24: 3001–3008.
37. Toledo KA, Schwartz C, Oliveira AF, Conrado MC, Bernardes ES, et al. (2009) Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett* 123: 14–20.
38. de Almeida Buranello PA, Moulin MR, Souza DA, Jamur MC, Roque-Barreira MC, et al. (2010) The lectin ArtinM induces recruitment of rat mast cells from the bone marrow to the peritoneal cavity. *PLoS one* 5: e9776.
39. Barbosa-Lorenzi VC, Buranello PA, Roque-Barreira MC, Jamur MC, Oliver C, et al. (2011) The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 318–324.
40. Pereira-da-Silva G, Carvalho FC, Roque-Barreira MC (2012) Neutrophil activation induced by plant lectins: modulation of inflammatory processes. *Inflamm Allergy Drug Targets* 11: 433–441.
41. da Silva TA, de Souza MA, Cecilio NT, Roque-Barreira MC (2014) Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. *Cell Tissue Res* 10.1007/s00441-014-1879-8.
42. Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, Santiago FM, Carvalho JV, et al. (2011) ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. *Vaccine* 29: 9183–9193.
43. Custodio LA, Loyola W, Conchon-Costa I, da Silva Quirino GF, Felipe I (2011) Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol* 11: 1510–1515.
44. Coltri KC, Oliveira LL, Ruas LP, Vendruscolo PE, Goldman MH, et al. (2010) Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Med Mycol* 48: 792–799.
45. Coltri KC, Casabona-Fortunato AS, Gennari-Cardoso ML, Pinzan CF, Ruas LP, et al. (2006) Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. *Microbes Infect* 8: 704–713.
46. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, et al. (2006) Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol* 154: 643–650.
47. Benard G (2008) An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 165: 209–221.
48. Calvi SA, Peracoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, et al. (2003) Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* 5: 107–113.
49. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G (2002) IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine* 18: 149–157.
50. Wetzler LM (2003) The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* 21 Suppl 2: S55–60.
51. Takeuchi O, Kawai T, Muhlrath PF, Morr M, Radolf JD, et al. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933–940.
52. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, et al. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10–14.
53. da Silva Correia J, Ulevitch RJ (2002) MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem* 277: 1845–1854.
54. Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB (2007) Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 82: 237–243.