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

RICARDO SOUZA CAMARGO

Papel do receptor NOD2 no controle da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Ribeirão Preto, SP

2019

RICARDO SOUZA CAMARGO

Papel do receptor NOD2 no controle da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto, SP

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Camargo, Ricardo Souza

Papel do receptor NOD2 no controle da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, Ribeirão Preto, 2019.

70 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Silva, João Santana

1. Nod2. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3. Rip2. 4. Pulmão. 5. Linfócitos T gamma-delta. 6. Linfócito Th17

Nome: Ricardo Souza Camargo

Título: Papel do receptor Nod2 no controle da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Receptores Nod1 e Nod2 na infecção com Paracoccidioides brasiliensis*", registrado com o número **005/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Santana da Silva**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 26 de fevereiro de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 150 camundongos C57Bl/6 machos pesando 21g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 150 camundongos Nod-1 KO machos pesando 21g, 150 camundongos Nod-2 KO machos pesando 21g, 150 camundongos RIP-2 KO machos pesando 21g, oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/02/2018 a 30/05/2019.

We certify that the Protocol **nº 005/2018**, entitled "*Nod1 and Nod2 receptors in Paracoccidioides brasiliensis infection*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/26/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 150 male C57Bl/6 mice weighing 21g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School; 150 male Nod-1 KO mice weighing 21g, 150 male Nod-2 KO mice weighing 21g, 150 male RIP-2 KO mice weighing 21g from the Breeding Center of Special Mice of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 05/30/2019.

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP - USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvano e Celeste, e a minha irmã Renata, que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, me guiaram pelos caminhos corretos e me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais para vida. Sou extremamente grato pelo amor imensurável que sempre demonstraram por mim. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Diante este momento, primeiramente gostaria de agradecer à Deus por nunca ter me abandonado nos momentos mais difíceis da minha vida. Por tudo que já conquistei, acredito que sem ti eu jamais conseguiria. Para um garoto de 18 anos, que nunca saiu do seu estado, chegar em uma nova cidade sem conhecer ninguém e após 9 anos ver tudo sendo construído da forma que sempre sonhou, realmente, nunca foi sorte, foi sempre Deus. Gratidão;

Painho, Mainha e Nina, eu não tenho palavras para agradecer o quanto vocês foram heróis para formação da nossa família. Jamais esquecerei que nos momentos mais difíceis das nossas vidas, nunca deixaram faltar o amor e esperança entre nós. Se hoje estou aqui, foi graças a vocês. Sou grato por todo esforço que fizeram para eu poder estar aqui. Recompensarei cada gota de suor derramada. Eu prometo! Amo vocês;

Gostaria de agradecer a minha namorada Ayra, por sempre permanecer ao meu lado e nunca ter duvidado da minha capacidade. Por todas as vezes que me acalmava nos momentos mais turbulentos que passei nesses dois últimos anos. Obrigado pela paciência e companheirismo;

Agradeço ao meu melhor amigo Luke. Nós somos a prova viva de uma amizade verdadeira. Meu amigo irmão, mais uma missão está sendo concluída e tenho a sorte de ter você ao meu lado. *Heaven's got a plan for you*;

Ao meu sábio orientador Prof. Dr. João Santana, pelos ensinamentos e confiança. Obrigado por ter me acolhido e ter sido paciente durante essa minha jornada. Mesmo sem o senhor lembrar, em 2013 pude conhece-lo muito rapidamente, e a partir daquele dia decidi que caso conseguisse entrar no mestrado, queria poder fazer parte da sua equipe. Neste momento, posso dizer com imenso orgulho que fui um dos seus alunos. Foram momentos de adaptação e aprendizados que jamais esquecerei. Obrigado pelo respeito, aprendizado, transparência e por me mostrar que a ciência vai muito além de um simples experimento. O senhor é um exemplo a ser seguido;

A Prof. Dr^a. Daniela Carlos, por ter sido conselheira e pelo apoio doado no momento fundamental deste trabalho;

A Prof. Dr^a. Vanessa Carregaro, pela prudência e compreensão. Obrigado pelas orientações;

Aos companheiros de laboratório e departamento, Cleyson, Herculano, Natália, Kiyoshi, Camila, Jefferson, Eduardo, Isabel, Laís, Luciana, Allyne, Maria Cláudia, Alana e Tamara que contribuíram para realização deste trabalho, desde a realização de experimentos até as críticas construtivas que fizeram ao longo desses anos. Vocês foram fundamentais nessa jornada;

Gostaria de agradecer aos colaboradores externos, Gustavo Quirino, Renan e David C3lon. Voc3es foram cruciais para a finaliza33o deste trabalho. Agrade3o pelo tempo cedido, ajuda em experimentos e pelas discuss33es cient3ficas;

Aos funcion3rios, Wander, Cristiane, Vera, Denise, Rubilan, Wendy, Edinelson e J3lio pela efici3ncia e suporte que me deram nessa jornada;

A Ana Cristine pelos conselhos e pelo profissionalismo, estando sempre disposta para ajudar;

À Coordena33o de Aperfei3oamento de Pessoal de N3vel Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e à Funda33o de Amparo à Pesquisa do Estado de S3o Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cient3fico e Tecnol3gico (CNPq) e a Funda33o de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assist3ncia (FAEPA) pelo apoio financeiro para a realiza33o desta pesquisa;

A Faculdade de Medicina de Ribeir3o Preto (FMRP-USP), ao Programa de P3s-gradua33o em Imunologia B3sica e Aplicada, pelo apoio institucional e infraestrutura;

RESUMO

Camargo, RS. **Papel do receptor NOD2 no controle da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2019, 70.

O receptor NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*), pertencente à família dos receptores tipo NOD (NLRs), atua na detecção intracelular de peptídeoglicano conservado em bactérias. Utilizando a molécula adaptadora RIP2 para desencadear vias de sinalização pró-inflamatórias, o receptor NOD2 é caracterizado por sua ação na proteção contra infecções bacterianas. No entanto, trabalhos recentes veem demonstrando seu papel no controle da disseminação de patógenos não-bacterianos, assim como, sua influência na modulação da resposta imune adaptativa Th17. Levando em consideração que a resposta Th17 é importante para imunidade antifúngica e que não há relatos na literatura que correlacionem o envolvimento do receptor NOD2 com infecções fúngicas sistêmicas, nós decidimos investigar a sua ação durante a paracoccidioidomicose (PCM), micose granulomatosa sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Portanto, no presente estudo foram utilizados animais WT (C57Bl/6), *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} para avaliar a participação do receptor NOD2 e sua molécula adaptadora RIP2 na paracoccidioidomicose experimental. Os resultados obtidos, demonstraram que na ausência das moléculas NOD2 e RIP2 os animais se tornaram mais resistentes durante a PCM, apresentando menor carga fúngica nos dias 7, 15 e 30 após infecção. Durante análise histológica do pulmão, foi constatado que os animais *Nod2*^{-/-} apresentavam granulomas mais organizados e presença maciça de leucócitos na porção interna do granuloma quando comparado aos animais controles. Para investigar a razão pela qual a ausência desta molécula proporciona a formação de granulomas mais compactos, foi dosado TNF- α de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) estimulado por *P. brasiliensis* e do homogenato pulmonar de camundongos infectados com *P. brasiliensis* no 15º dpi. Não foi encontrada diferença significativa na produção de TNF- α em ambos os grupos nas diferentes situações. No entanto, procurando explicação para tal fenômeno, as expressões dos genes *IL-6* e *IL-23p19* foram avaliadas por qPCR no 7º e 15º dpi a partir do tecido pulmonar dos camundongos infectados. Comparado aos camundongos WT e *Rip2*^{-/-}, os animais *Nod2*^{-/-} exibiram um aumento significativo da expressão de *IL-6* e *IL-23p19* durante o período de infecção estabelecido. Além disso, os animais *Nod2*^{-/-} também apresentaram aumento da produção das citocinas IL-6 (7º, 15ºdpi) e IL-23 (7º, 30ºdpi) em relação aos camundongos WT e *Rip2*^{-/-}. Este resultado sugere que o receptor NOD2 reprime a produção de IL-6 e IL-23 durante a PCM. Sabendo que essas citocinas induzem a síntese de IL-17, decidimos investigar sua produção durante a PCM. Como resultado, observamos que na ausência de NOD2 a produção de IL-17 estava potencializada nos dias 7 e 15 pi. Adicionalmente, identificamos por citometria de fluxo que os linfócitos CD3+ produtores de IL-17 presentes nos pulmões dos camundongos *Nod2*^{-/-}, estavam em maior quantidade que nos animais controles (WT, *Rip2*^{-/-}) no terceiro e sétimo dpi. Dentre as células CD3+ totais, identificamos que os linfócitos CD4+ dos camundongos *Nod2*^{-/-} também produziam mais IL-17. No entanto, descobrimos que os animais ausentes do receptor NOD2, a maior produção de IL-17 é proveniente dos linfócitos $\gamma\delta$, fenômeno que não ocorre entre os camundongos WT e *Rip2*^{-/-}. Com o intuito de investigar o papel do receptor NOD2 nos linfócitos CD4+, a partir dos linfócitos CD3+ *naïves* isolados dos linfonodos e baço, fomos avaliar o seu efeito na polarização para Th17. Detectamos que os linfócitos *Nod2*^{-/-} demonstrou uma maior polarização para o perfil Th17 quando comparados as células WT e *Rip2*^{-/-}. Por fim, comparado aos grupos controles, os animais *Nod2*^{-/-} apresentaram maior migração de neutrófilos na fase aguda da

PCM. Em conclusão, estes dados mostram que o receptor NOD2 tem papel importante na suscetibilidade do hospedeiro durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras chaves: Nod2; *Paracoccidioides brasiliensis*; Rip2; IL-17; Linfócito T gamma-delta; Linfócito Th17.

ABSTRACT

Camargo, RS. **The role of the NOD2 receptor in the control of *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** Masters dissertation. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2019, 70.

The NOD2 receptor (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) is a member of NOD receptor family (NLRs) which acts on the intracellular detection of bacterially conserved peptidoglycan. Using the RIP2 adaptor molecule to trigger proinflammatory signaling pathways, the NOD2 receptor is characterized by its function on recognition and protection against bacterial infections. However, recent studies have demonstrated its role in controlling the spread of non-bacterial pathogens, as well as its influence in the modulation of Th17 adaptive immune response. Taking into account that the Th17 response is important for antifungal immunity and that there are no reports in the literature correlating NOD2 receptor involvement with systemic fungal infections, we aimed to investigate its role during paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic granulomatous mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. Therefore, in the present study WT (C57BL/6), *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} mice were used to evaluate the participation of NOD2 receptor and RIP2 in experimental paracoccidioidomycosis. The results show that in the absence of NOD2 and RIP2 molecule the animals were more resistant to PCM, presenting fewer colony-forming units (CFU) on days 7, 15 and 30 post infection. During lung histological analysis revealed that *Nod2*^{-/-} mice presented more organized granulomas and massive presence of leukocytes inside the granuloma when compared to naïve control animals. To investigate the reason why the absence of this molecule results in the formation of compact granulomas, TNF-α levels were evaluated from *P. brasiliensis* stimulated bone marrow-derived macrophages (BMDM) and pulmonary homogenate from mice infected with *P. brasiliensis* at 15° pi. There was no significant difference in TNF-α production in both groups in different situations. However, *IL-6* and *IL-23p19* gene expression were evaluated by qPCR at 7° and 15° from the lung tissue of infected mice. Comparing WT and *Rip2*^{-/-} mice, the *Nod2*^{-/-} animals showed a significant increase in *IL-6* and *IL-23p19* expression during infection. In addition, *Nod2*^{-/-} mice showed increased production of IL-6 (7°, 15° pi) and IL-23 (7°, 30° pi) compared to WT mice. This result suggests that the NOD2 receptor represses IL-6 and IL-23 production during PCM. Taking into consideration that these cytokines induce IL-17 synthesis, we found that in the absence of NOD2, IL-17 production was enhanced in the 7th and 15th dpi. Additionally, we identified by flow cytometry that the IL-17-producing CD3⁺ lymphocytes present in the lungs of *Nod2*^{-/-} mice were higher than in the control animals (WT, *Rip2*^{-/-}) in the third and seventh dpi. Among the total CD3⁺ cells, we identified that the CD4⁺ lymphocytes of *Nod2*^{-/-} mice also produced more IL-17. However, we found that the absence of NOD2 receptor led to higher IL-17 production from lymphocytes Tγδ, which does not occur in WT and *Rip2*^{-/-} mice. To investigate the role of NOD2 receptor on CD4⁺, CD3⁺ lymphocytes were isolated from naive lymph nodes and spleen, to evaluate the polarization to Th17. We detected that *Nod2*^{-/-} lymphocytes showed a greater polarization for the Th17 profile when compared to WT and *Rip2*^{-/-} cells. Finally, compared to the control groups, *Nod2*^{-/-} animals presented higher neutrophil migration to the lungs in the acute phase of PCM. In conclusion, these data show that the NOD2 receptor plays an important role in host susceptibility during *P. brasiliensis* infection.

Keywords: *Nod2*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Rip2*; IL-17; Gamma-delta T lymphocyte; Th17 lymphocyte.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em tempo real.....	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de sinalização dos receptores da imunidade inata	20
Figura 2. O receptor NOD2 contribui para susceptibilidade do hospedeiro contra o fungo <i>P. brasiliensis</i>	41
Figura 3. Camundongos deficientes de NOD2 apresentam granulomas compactos durante a PCM experimental.	43
Figura 4. A ausência do receptor NOD2 não interfere na produção de TNF- α durante desafio com Pb18 in vitro em BMDC e infecção experimental in vivo.	44
Figura 5. A produção de IL-6 e IL-23 é modulada negativamente na presença do receptor NOD2 durante PCM experimental	46
Figura 6. A ausência do receptor NOD2 intensifica a produção de IL-17 desencadeada pela infecção por <i>P. brasiliensis</i>	47
Figura 7. Animais deficientes de NOD2 têm maior quantidade de linfócitos TCD4 ⁺ e T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 na fase inicial da PCM experimental.....	49
Figura 8. Células TCD4 ⁺ naíves ausentes da molécula NOD2 tem polarização acentuada para o perfil Th17	50
Figura 9. O recrutamento de neutrófilos e monócitos sofre interferência na ausência de NOD2 durante infecção experimental.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Imunidade inata</i>	17
1.2. <i>Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)</i>	18
.....	20
1.3. <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2)</i>	20
1.4. <i>Micose sistêmica</i>	23
1.4.1 <i>Aspectos gerais da Paracoccidioidomicose</i>	23
1.4.2 <i>Resposta imune na paracoccidioidomicose</i>	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	28
2.2 <i>Objetivo específico</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 <i>Cultura de leveduras de P. brasiliensis</i>	30
3.2 <i>Meio BHI (Brain Heart Infusion)-ágar</i>	30
3.3 <i>Preparo das leveduras para inóculo</i>	30
3.4 <i>Viabilidade das leveduras</i>	30
3.5 <i>Animais experimentais e infecção com Pb18</i>	31
3.6 <i>Recuperação de fungos e contagem de unidade formadoras de colônia (CFU)</i>	31
3.7 <i>Obtenção do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)</i>	32
3.8 <i>Dosagem de citocinas por ELISA</i>	32
3.9 <i>Análise histopatológica do pulmão</i>	33
3.10 <i>Imunohistoquímica (IHQ)</i>	33
3.11 <i>Extração de RNA total de tecido pulmonar</i>	34
3.12 <i>Síntese de cDNA</i>	34
3.13 <i>Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)</i>	35
3.14 <i>Diferenciação de macrófago a partir da medula óssea</i>	36
3.15 <i>Isolamento dos leucócitos pulmonares</i>	37
3.16 <i>Citometria de fluxo</i>	37
3.17 <i>Isolamento de células T naives e diferenciação para Th17 in vitro</i>	38
3.18 <i>Análise estatística</i>	39

4. RESULTADOS	41
4.1. <i>A deficiência do receptor NOD2 aumenta a resistência a PCM experimental</i>	<i>41</i>
4.2. <i>Ausência do receptor NOD2 interfere na formação do granuloma</i>	<i>42</i>
4.3. <i>A ausência do receptor NOD2 resulta no aumento da expressão e produção de IL-6 e IL-23 durante infecção por P. brasiliensis.....</i>	<i>45</i>
4.4. <i>Camundongos deficientes para NOD2 apresentam aumento na produção de IL-17 por células T gamma-delta ($\gamma\delta$) e CD4⁺ durante infecção experimental por P. brasiliensis.....</i>	<i>47</i>
4.5. <i>O receptor NOD2 no linfócito CD4⁺ regula de maneira intrínseca a diferenciação de Th17.....</i>	<i>50</i>
4.6. <i>Camundongos deficientes para NOD2 apresentam aumento de neutrófilos no pulmão durante a fase aguda da infecção experimental com P.brasiliensis.</i>	<i>51</i>
5. DICUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Imunidade inata*

Constantemente nosso corpo está em contato com uma vasta quantidade de microorganismos, sendo eles patogênicos ou comensais, os quais necessitam ser controlados para não desencadear infecção que resulte em prejuízo ao hospedeiro (JANEWAY et al., 2001). Desta forma, providenciando a primeira linha de defesa do organismo, o sistema imune inato é um mecanismo de proteção evolutivamente conservado que tem como finalidade prevenir o desenvolvimento de infecções (DEMPSEY; VAIDYA; CHENG, 2003). Caracterizado como uma resposta rápida e de baixa especificidade aos estímulos estranhos, a imunidade inata consiste em mecanismos de defesa pré-existentes (barreiras físicas e fisiológicas, células e moléculas solúveis) que trabalham de maneira ordenada para garantir a homeostasia do indivíduo (MEDZHITOV; JANEWAY JR, 2000).

As barreiras físicas e fisiológicas são formadas pela pele intacta, pH ácido do estômago, atividade antimicrobiana de lisozimas encontradas nas lágrimas e salivas, movimento mucociliar para eliminação de bactérias do trato respiratório e substâncias antimicrobianas liberadas pelo epitélio (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Já as células envolvidas na imunidade inata são principalmente provenientes das células hematopoiética (com exceção as células epiteliais) que após diferenciação formam um grupo de células chamadas de leucócitos. Estes leucócitos pertencentes a imunidade inata podem ser de diferentes precursores mielóide, sendo elas: de origem granulocítica, que formarão os eosinófilos, neutrófilos e basófilos; e as provenientes do monoblasto, que darão origem aos monócitos/macrófagos e as células dendríticas (ressaltando que também existe células dendríticas de origem linfocítica) (MEDZHITOV; JANEWAY JR, 2000).

Os monócitos são leucócitos circulantes que dão origem a macrófagos e células dendríticas mielóides ao chegarem no tecido. Os macrófagos estão presentes na maioria dos tecidos, onde coordenam diversas funções fisiológicas, metabólicas e imunológicas (GORDON; MARTINEZ-POMARES, 2017). De acordo com as condições do microambiente e origem da progenitora, estas células podem desempenhar funções imunológicas distintas, podendo desenvolver um perfil inflamatório com alta capacidade microbicida (NATHAN et al., 1983), ou uma função anti-inflamatória atuando no reparo tecidual e cicatrização (STEIN et al., 1992). Com um papel primordial no controle à infecções induzidas por fungos e bactérias extracelulares, os neutrófilos são os leucócitos presentes em maior quantidade no sangue

periférico, sendo as primeiras células a migrarem do vaso sanguíneo para o tecido inflamado (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014). Possuem características microbicidas que as diferem entre os leucócitos; dentre elas destacamos a enzima mieloperoxidase (MPO) que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HOCl) que é uma das mais poderosas espécies reativas de oxigênio no combate a patógenos invasores (MCCRACKEN; ALLEN, 2014).

Para que os leucócitos possam ser ativados e atuem frente ao invasor, primeiramente é necessário que haja o reconhecimento destes por meio de estruturas conservadas características dos patógenos microbianos. Estas estruturas conhecidas como Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) são encontradas em todas as classes de microorganismos (TANG et al., 2012). A identificação destas moléculas é realizada através da interação com diferentes receptores, chamados de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, do inglês *Pattern recognition receptor*) que após sinalizados desencadeiam diversos mecanismos de defesa para controle da infecção como a fagocitose e produção de citocinas (BIANCHI, 2007; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

1.2. Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)

Logo após o contato com um agente infeccioso o organismo precisa ser alertado sobre o agente invasor. A identificação é feita através de receptores da imunidade inata, os PRR, que além de reconhecerem os PAMPs, conseguem identificar sinais de perigo endógenos proveniente de mortes celulares, devido à danos microbianos ou em resposta ao estresse celular. Estes sinais são denominados como Padrões Moleculares Associados a Dano (DAMPs, do inglês *Danger-Associated Molecular Patterns*) (RUBARTELLI; LOTZE, 2007).

Podemos destacar dois pontos importantes para o entendimento dos PAMPs. Primeiro, os PAMPs são encontrados apenas nos microorganismos, e não nas células do hospedeiro, diferenciando assim o próprio do não-próprio; segundo ponto, eles são conservados entre os organismos da mesma classe, sendo necessário apenas um número limitado de PRR para o reconhecimento de uma vasta gama de microorganismos (MEDZHITOV, 2001). Alguns PAMPs, tais como lipopolissacarídeo (LPS) (encontrados em bactérias Gram negativas), ácidos nucleicos de vírus (RNA de fita simples e RNA de fita dupla) e polissacarídeos de parede celular fúngica (mananas e glucanas) ativam diferentes tipos de PRRs, os quais são divididos de acordo com sua estrutura e localização. Dentre eles destacamos: receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like Receptors*), receptores de lecitina tipo C (CLR, do inglês *C-type lectin receptors*) e

receptores tipo NOD (NLR, do inglês *NOD-Like Receptors*) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Os TLRs podem estar expressos na superfície celular, como os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6, responsáveis pelo reconhecimento de estruturas como LPS, peptídeoglicanos e flagelo bacteriano. Já os TLRs 3, 7 e 9, localizados no endossoma, reconhecem ácidos nucleicos virais, RNA dupla fita, RNA fita simples e CpG DNA viral (MEDZHITOV, 2001). Após sinalização dos receptores do tipo *toll* ocorre o recrutamento de diferentes moléculas adaptadoras, sendo as mais estudadas MyD88 e TRIF. Ambas, podem ativar duas vias distintas que levam para indução de citocinas pró-inflamatórias ou transcrição de interferon (IFN) do tipo I (DE NARDO, 2015).

Diferente dos receptores do tipo *toll*, os NLRs são moléculas solúveis citoplasmáticas que compreende uma grande família de receptores constituídos por uma molécula central conservada NATCH (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (INOHARA; NUÑEZ, 2001). A estrutura desses receptores é formada por uma região C-terminal rica em repetições de leucina (LRR) que reconhece o ligante de ativação; molécula NATCH necessária para oligomerização dos receptores após sinalização; e um domínio N-terminal responsável pela função efetora do receptor (TING et al., 2008).

A família dos NLRs é subdividida em cinco famílias de acordo com a molécula da região N-terminal, que pode ser: um domínio de transativação ácida (NLRA); domínio de repetição de proteínas inibidoras de apoptose baculovírus (NLRB); domínio recrutador de caspases (CARD, do inglês *Caspase Recruitment and Activation Domain*) (NLRC); domínio pirina (NLRP); e domínio de direcionamento para mitocôndria (NLRX) (TING et al., 2008). Esse grande espectro de receptores reconhecem uma gama de ligantes patogênicos microbianos (moléculas de adesão, flagelina, hifa de fungo, peptídeo da parede celular), metabólitos da própria célula (ATP, cristais de colesterol, ácido úrico), ou fatores ambientais (radiação UV, sílica, poluentes ambientais) (KIM; SHIN; NAHM, 2016).

Após ativação, os NLRs oligomerizam-se através do domínio NOD formando plataformas de ativação, tendo finalidades distintas dependendo do seu domínio N-terminal (**Figura 1**) (MARTINON; TSCHOPP, 2005). Um grupo consiste em receptores como NLRP1, NLRP3, NLRP12 e NLRC4, que após sua sinalização, oligomerizam-se e formam plataformas de ativação catalíticas, denominadas inflamassoma. Esta plataforma formada através de seus domínios N-terminais iniciam o recrutamento da molécula ASC (também conhecida como PYCARD) que medeia a ativação da protease caspase e consequentemente clivam as citocinas pro-IL-1 β e pro-IL-18, tornando-as funcionais para atuarem como mediadores inflamatórios

(DAVIS; WEN; TING, 2011). Por outro lado, alguns dos receptores da família dos NLRs assim como NOD2 pertencente a subfamília dos NLRC, se enquadram em outra categoria de funcionalidade, atuando como ativadores de proteíno-quinases ativadas por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogen activated protein kinase*) e fator nuclear- κ B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor- κ B*). Essas moléculas são responsáveis pela expressão e transcrição gênica de peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, pro-IL-1 β , IL-23 (KUFER; SANSONETTI, 2011). Embora a maioria dos NLR interajam com moléculas que contêm o domínio pirina, a proteína NOD2 recruta a proteína interativa do receptor quinase 2 (RIP2) via domínio CARD, dando início a ativação e regulação das cascatas de sinalização inflamatória (GODL et al., 2003; RAHIGHI et al., 2009).

Figura 1: Esquema de sinalização dos receptores da imunidade inata (JIN; PARK; JO, 2014)

1.3. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2)

Codificado pelo gene *CARD15* (no cromossomo 16 em humanos), o receptor NOD2 pertence à família dos NLRC. Similar as proteínas dos NLR, ele é composto por uma região de oligomerização NATCH, um domínio C-terminal LRR que reconhece o ligante e um domínio N-terminal constituído por dois domínios CARD em sequência (INOHARA; NUÑEZ, 2003). O receptor NOD2 é um sensor microbiano intracelular que identifica peptídeoglicanos (PGN) através do reconhecimento do dipeptídeo muramil (MDP) conservado na parede de bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas (GIRARDIN et al., 2003). Estudos demonstram que a ausência do receptor NOD2 está associada ao aumento da susceptibilidade a algumas infecções bacterianas (THEIVANTHIRAN et al., 2012, p. 2).

Encontradas no citosol, a maior parte da expressão da proteína NOD2 é restrita a células de origem mieloide e linfóide tais como células dendríticas (INOHARA et al., 2005), macrófagos (OGURA et al., 2001) e linfócitos TCD4⁺ (ZANELLO et al., 2013). Após sinalização deste receptor, ocorre uma mudança conformacional que promove a oligomerização entre as proteínas NOD2 resultando na junção com a molécula adaptadora RIP2, via interações CARD-CARD (KOBAYASHI et al., 2002). Essa interação é acompanhada pelo recrutamento da E3ligase TRAF6 para ubiquitinação de RIP2, que medeia o recrutamento da quinase TAK1 (do inglês, *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*). Posteriormente, há a formação do complexo TAK1/TAB2/TAB3 para ativação do complexo enzimático IKK, que degrada o inibidor do fator de transcrição NF- κ B (I κ B α) pelo proteassoma. Esse processo permite a ativação de NF- κ B que migra para o núcleo e se liga a regiões específicas do DNA iniciando assim a transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório (HASEGAWA et al., 2008). Semelhante via de ativação NF- κ B, a sinalização NOD2-RIP2 pode ativar p38, proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK, do inglês *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) e c-Jun N-terminal quinase (JNK) todas pertencentes a família das MAPK (NAVAS; BALDWIN; STEWART, 1999), importantes para o controle do ciclo celular, transcrição gênica, apoptose, estresse oxidativo e metabolismo energético (HUANG; SHI; CHI, 2009). Concomitantemente, essa ativação leva ao aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α e quimioatraentes de neutrófilos como CXCL8 auxiliando na resposta inata (ROSENSTIEL et al., 2003, p. 15, 2003).

Para que ocorra um equilíbrio homeostático durante sinalização de NOD2, há diversos mecanismos que regulam positivamente ou negativamente a sua ativação funcional. Dentre eles destacamos os reguladores negativos Erbin e IRF4. Desencadeando um papel fundamental no controle da sinalização de NOD2, a proteína Erbin liga-se ao domínio LRR do receptor NOD2 impossibilitando a sinalização induzida por MDP (MCDONALD et al., 2005). Já o fator regulador de interferon 4 (IRF4), bloqueia a ubiquitinação de RIP2 por TRAF6, inibindo assim a sinalização após ativação de NOD2 (WATANABE et al., 2014). Por outro lado, as proteínas HSP70, PDZ e FERM atuam como reguladores positivos durante sinalização via NOD2. A molécula HSP70 interage com o receptor NOD2 estabilizando-o e aumentando sua meia-vida. Enquanto isso, as proteínas PDZ e FERM favorecem a localização do NOD2 no citoplasma

facilitando o recrutamento de RIP2. Esse mecanismo de regulação, consequentemente, acarretará no aumento da atividade transcricional do fator de transcrição NF- κ B, (LIPINSKI et al., 2012; MOHANAN; GRIMES, 2014).

Além de exercer função primordial na imunidade inata, os NLRs influenciam na modulação da imunidade adaptativa. Esses receptores podem controlar a migração das células dendríticas durante a inflamação (ARTHUR et al., 2010), regular a transcrição de moléculas de MHC (LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2004) e modular a diferenciação de células T via produção de citocinas importantes para polarização celular (FRITZ et al., 2007). Magalhães e colaboradores demonstraram que ativação de NOD2 por seu agonista MDP em modelo animal, induz a uma rápida produção de MCP-1, que estimula a iniciação da resposta imune adaptativa com perfil Th2 (MAGALHAES et al., 2008). Por outro lado, outros estudos demonstraram que o receptor NOD2 regula a resposta Th17 via indução de microRNA29 (miR-29) em células dendríticas, inviabilizando a expressão de subunidades IL-12p40 e IL-23p19 que formam a citocina IL-23 importante para diferenciação das células Th17 (BRAIN et al., 2013).

Como já mencionado, o receptor NOD2 está envolvido no reconhecimento e controle de infecções bacterianas, tais como: *Streptococcus pneumoniae* (OPITZ et al., 2004), *Escherichia coli* (THEIVANTHIRAN et al., 2012), *Shigella Flexneri* (KUFER et al., 2006) e *Listeria monocytogenes* (KOBAYASHI et al., 2005). No entanto, novos trabalhos vêm destacando uma possível relação entre NOD2 e patógenos não bacterianos. Neste âmbito, curiosamente, foi mostrado que pacientes com polimorfismo do gene NOD2 e infectados com *Toxoplasma gondii*, desenvolviam a forma mais severa da doença devido à alta produção de IL-17 (DUTRA et al., 2013). Recentemente, foi relatada a importância do receptor NOD2-RIP2 na indução da resposta Th1 durante infecção com protozoário. Nesse estudo, foram utilizados camundongos *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} deficientes infectados com *Leishmania infantum* e notaram que tais animais não desenvolveram uma resposta imune Th1 eficiente, comprovando que a geração de uma resposta Th1 é dependente de NOD2 e RIP2 (NASCIMENTO et al., 2016).

Por outro lado, pouco se sabe sobre o papel do receptor NOD2 frente infecções fúngicas. Alguns estudos vêm demonstrando relações entre NOD2 e os TLRs no reconhecimento da parede celular fúngica. Entre esses achados, evidenciamos a participação do receptor NOD2 juntamente ao TLR9 na produção de IL-10 durante reconhecimento de quitina (WAGENER et al., 2014); e um envolvimento com TLR7 na produção de IL-27 durante infecção *in vitro* com *C. parapsilosis* (PATIN et al., 2016). Sendo assim, sabendo que não há evidências claras do envolvimento do receptor NOD2 durante infecções fúngicas, nós decidimos investigar a

participação deste receptor utilizando camundongos *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} no modelo de infecção experimental para indução de micose sistêmica.

1.4. Micose sistêmica

As micoses consistem em infecções causadas por fungos, e podem ser classificadas segundo o local de infecção: micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas (RICHARDSON; WARNOCK, 2012). Tendo como porta de entrada o trato respiratório, as micoses sistêmicas são desenvolvidas após a inalação de propágulos fúngicos que podem disseminar para outros órgãos ou tecidos. Esse tipo de micose desencadeia uma infecção primária no pulmão, e posteriormente difunde-se pela corrente sanguínea (RAZZUK; URSCHER; PAULSON, 1973). Os agentes etiológicos mais frequentes na micose sistêmica são fungos dimórficos, caracterizados como patogênicos primários, pois possuem mecanismos que lhes permitem a evasão do sistema de defesa do hospedeiro causando infecções tanto em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (SALZER et al., 2018). Os principais fungos dimórficos patogênicos são: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Estes fungos também são classificados como patógenos endêmicos, pois são encontrados em regiões geográficas específicas em que, a infecção gerada por estes é adquirida pela inalação de esporos no nicho específico no qual o fungo se encontra (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

1.4.1 Aspectos gerais da Paracoccidioidomicose

Uma das doenças fúngicas sistêmicas mais acometidas no Brasil é a paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa crônica, que tem como principal sítio de infecção o sistema respiratório (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). A primeira descrição da PCM foi publicada em 1908 no periódico Brazil-Medico pelo pesquisador brasileiro Adolpho Lutz, que atuava no instituto Bacteriológico de São Paulo. O estudo trazia caracterização da paracoccidioidomicose após observações e análises em lesões bucais que continham fungos dimórficos, distintos do *Coccidioides immitis*, que persistiam em pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia (LUTZ, 1908).

A distribuição geográfica da PCM é restrita à países da América Latina, com maior incidência na Argentina, Brasil, Colômbia, Equador e Venezuela (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Estendendo-se do México a Argentina, a distribuição da PCM não é homogênea, sendo a América do Sul o subcontinente que tem a maior prevalência da doença, devido as condições ambientais como: vegetação tropical ou subtropical, solo ácido, temperatura entre 17-24°C e

alto índice pluviométrico que favorecem o crescimento e disseminação do fungo (RESTREPO-MORENO, 2018). Mesmo não sendo uma doença de notificação compulsória, estima-se que a taxa de mortalidade entre 1980 e 1995 foi de 1,45 por milhão de habitantes, juntamente com o surgimento de 1-3 casos por 100.000 habitantes por ano em zonas endêmicas no Brasil (COUTINHO et al., 2002).

A PCM é causada pelo fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides* spp., que tem como principais espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e *Paracoccidioides lutzii* (*P.lutzii*). A espécie *P. brasiliensis* é composta por diferentes variáveis filogenéticas que agrupam diversas cepas, sendo elas S1, PS2, PS3 e PS4. Destacando a cepa Pb18 como a mais virulenta (KUROKAWA et al., 2005). Com características termodimórficas, o *P. brasiliensis* é encontrado em sua forma infectiva miceliana no solo a temperaturas em torno de 10-28°C. Após inalação dos seus conídios contidos em aerossóis, o fungo se instala nos bronquíolos e alvéolos. Uma vez fixado no tecido a 37°C transformam-se em leveduras (forma parasitária), podendo assim, disseminar por via hematogênica ou linfática para outros órgãos (BETHLEM et al., 1999; RESTREPO, 1985).

Estabelecida a infecção, ela pode ser classificada em duas formas clínicas que se diferenciam pelo tipo de manifestação e parâmetros imunológicos da patologia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). No desenvolvimento da forma aguda (tipo juvenil), caracterizada como a forma mais grave da doença, a infecção se propaga rapidamente para outros órgãos, causando linfonodomegalia localizada ou generalizada, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas e mucocutâneas, entretanto o acometimento pulmonar é menos frequente (WEBER et al., 2006). Já a forma crônica (tipo adulto) tem prevalência de 74 a 96% dos casos de PCM, afetando em sua maioria homens adultos com idade entre 30 e 60 anos. Com um desenvolvimento mais lento da doença, 90% destes pacientes apresentam comprometimento das vias aéreas superiores, da mucosa orofaríngea e dos pulmões com formação de fibrose, podendo levar a casos de insuficiência respiratória (FRANCO, 1989).

Em ambos os casos além da quantidade de inóculo e virulência da cepa, o sistema de defesa do hospedeiro está relacionada com a evolução ou contenção da PCM. Os indivíduos imunocompetentes que apresentam uma resposta inflamatória satisfatória, não há desenvolvimento da infecção, ocorrendo a resolução do processo (WANKE; AIDÊ, 2009). No entanto, quando o fungo permanece nesses locais, em estado latente, porém viável, a infecção pode progredir e dar origem as diferentes formas clínicas da PCM. A forma aguda está associada à resposta imune menos eficiente, com a disseminação rápida para outros órgãos

levando ao pior prognóstico da PCM. Por outro lado, a forma crônica surge a partir de focos quiescentes, cujo o paciente apresenta uma depressão da resposta imune, mas em menor espectro quando comparado a fase aguda (MOTA et al., 1985).

1.4.2 Resposta imune na paracoccidioidomicose

A primeira interação parasito-hospedeiro acontece nos alvéolos. Após fixação nos pulmões, o fungo caso não seja eliminado, pode disseminar para outros órgãos via linfohematogênica. Sendo assim, após reconhecimento do fungo pelos receptores inatos, o tecido do hospedeiro desencadeia reações inflamatórias dando início a formação de estruturas granulomatosas com o objetivo de conter a proliferação e disseminação fúngica (FRANCO et al., 1988). Na fase inicial da infecção, com o recrutamento predominante de neutrófilos, citocinas como TNF- α e TGF- β induzem a formação de colágeno e auxiliam na quimiotaxia de macrófagos para o foco infeccioso (ROACH et al., 2002). Estes macrófagos, sofrem modificações estruturais transformando-se em células gigantes e epitelióide, as quais, juntamente com as células dendríticas e subconjuntos de linfócitos darão início à formação de granulomas, orquestrado por citocinas e quimiocinas (WILLIAMS; WILLIAMS, 1983).

Durante a PCM, é sabido que a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T está relacionada as diferentes apresentações clínicas da doença (MENDES-GIANNINI et al., 2008). A maioria dos indivíduos infectados por *Paracoccidioides spp* que vivem em regiões endêmicas e não desenvolvem PCM ou foram curados, apresentam um perfil de resposta mediadas por linfócitos T *helper* (Th)1, que é caracterizado pela produção de citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α (BENARD, 2008). Neste âmbito, foi demonstrado por modelos experimentais o efeito sinérgico dessas citocinas, as quais são essenciais para a resistência do hospedeiro, tais como: indução de IFN- γ por meio da IL-12 que promove a atividade fungicida dos macrófagos e linfócitos citotóxicos (CANO et al., 1998; ROMANO et al., 2002); TNF- α que atua na contenção e disseminação do fungo auxiliando na formação do granulomas (FIGUEIREDO; ALVES; SILVA, 1993). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou, a partir de modelo experimental, a importância da citocina IL-18, proveniente da ativação NLRP3, no controle da carga fúngica e na formação de granuloma durante a PCM (KETELUT-CARNEIRO et al., 2015).

Por outro lado, estudos clínicos revelaram que pacientes apresentando quadros clínicos mais graves da PCM, como a forma aguda, tiveram predomínio da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos Th2. Nesse tipo de resposta há uma síntese elevada de citocinas

associadas à susceptibilidade da PCM, como IL-4, IL-10 e TGF- β , que atuam inibindo a reação granulomatosa e a resposta Th1 (MATTHAEI; FOSTER; YOUNG, 1997; SANDERSON, 1992). Seguindo essas observações, durante análises histológicas em tecidos de pacientes que desenvolveram a forma severa da PCM foi identificada uma grande quantidade de eosinófilos produzindo MBP (proteína básica principal) em volta de leveduras de *P. brasiliensis*. Correlacionando a presença de eosinófilo e alta produção de proteínas granulares tóxicas com a fisiopatologia da PCM (WAGNER et al., 1998).

Há alguns anos atrás foi descoberto um novo tipo de linfócito T CD4+ produtor de IL-17, nomeado Th17 (PARK et al., 2005). Embora este perfil celular esteja associado com o desenvolvimento de diversas patologias inflamatórias autoimunes, os linfócitos Th17 são importantes para o controle de infecções acometidas por fungos e bactérias extracelulares (CURTIS; WAY, 2009; GAFFEN et al., 2014). A polarização para Th17 é iniciada após exposição de células TCD4+ *naïves* à IL-6 e TGF- β , que tem papel fundamental na inicialização dos fatores de transcrição STAT3 e ROR γ -T responsáveis pela indução da transcrição de IL-17 (BETTELLI et al., 2006). Embora não seja necessária para diferenciação das células Th17, a citocina IL-23 impulsiona tanto a diferenciação como as funções efetoras dos linfócitos Th17 (GAFFEN et al., 2014). Além das Th17, algumas células pertencentes a imunidade inata como as células linfóide inata (ILCs), linfócitos T gamma-delta ($\gamma\delta$) e células *natural killer* T (NKT) possuem o fator de transcrição ROR γ T que as possibilitam produzir IL-17 (CUA; TATO, 2010, p. 17).

Os receptores para IL-17 são distribuídos em vários tecidos, como baço, pulmão e fígado, sendo os dois últimos os principais locais de crescimento do *P. brasiliensis*. A ligação da IL-17 ao seu receptor desencadeia sinalizações mediante ativação de NF- κ B e MAPK em células epiteliais, macrófagos e células endoteliais levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como GM-CSF, IL-6, IL-23 e CXCL8 que induzem o recrutamento de neutrófilos e consequentemente inflamação no tecido (GU; WU; LI, 2013). Embora o papel da IL-17 durante a PCM humana ainda não esteja muito claro (CASTRO et al., 2013), nosso grupo de pesquisa demonstrou que as citocinas associadas ao perfil de resposta Th17, como IL-6, IL-17A e IL-23, são importantes para o controle do fungo na formação de granuloma durante a PCM experimental (TRISTÃO et al., 2017). Sendo assim, sabendo que receptor da imunidade inata NOD2 pode interferir no desenvolvimento de uma resposta Th17, nós decidimos investigar o seu papel durante infecção com *P. brasiliensis*.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

- ✓ Avaliar a função do receptor NOD2 na modulação da resposta imune durante a paracoccidiodomicose experimental.

2.2. *Objetivo específico*

- ✓ Verificar se há participação do receptor NOD2 e sua molécula adaptadora RIP2 na resistência à infecção por
- ✓ Investigar o envolvimento do receptor NOD2 na formação do granuloma e na produção de citocinas pró-inflamatórias em animais infectados por Pb.
- ✓ Determinar a influência de NOD2 na indução da resposta Th17 e na migração de neutrófilos e monócitos para o pulmão de animais infectados com *P. brasiliensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de leveduras de *P. brasiliensis*

As amostras isoladas da cepa 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) foram cultivadas por 7 dias à temperatura média de 37°C em meio BHI (Brain Heart Infusion)-ágar suplementado com gentamicina.

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

Em 500 mL de água destilada foram adicionados 26g de infuso cérebro-coração ágar (BHI – Sigma-Adrich) e 5g de D(+) Glicose Anidra (C₆H₁₂O₆) (MERK). Após diluição dos solutos o meio foi esterilizado durante 15 minutos à 121°C. Atingindo a temperatura de aproximadamente 45°C foram adicionados gentamicina (48µg/mL) e 25 mL de soro fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies, Inc). Em seguida, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis (90 x 15 mm, Corning, NY, EUA) e armazenadas a 4°C.

3.3 Preparo das leveduras para inóculo

Após 7 dias de cultivo, as colônias de leveduras foram coletadas das placas contendo o meio BHI e transferidas para microtubos de centrifugação contendo 1 mL de meio F12 Coon's Modification (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), no qual, os grumos foram desfeitos pelo processo de sucção e sobrepressão usando pipeta graduada de 10 mL. Posteriormente, as colônias diluídas foram transferidas para uma garrafa de cultura estéril contendo 50 mL do meio F12 e mantidas sob agitação constante de 150 rpm à 37°C durante 24 horas. Após repouso, 30 mL da suspensão fúngica foi centrifugada por 10 minutos à 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado fúngico ressuspensionado em PBS estéril para contagem das leveduras na câmara de Neubauer. A concentração de células fúngicas foi ajustada para 1x10⁷ leveduras/mL em PBS estéril, sendo que 100 µL dessa solução foram inoculados em cada animal.

3.4. Viabilidade das leveduras

Para determinar a viabilidade das células leveduriforme, 100 µL da suspensão do fungo foi coletada e incubada com 100 µL de brometo de etídio (50mg/mL) e 100 µL de diacetato de fluoresceína (DAF) (2mg/mL) durante 10 minutos. A contagem das células viáveis foi realizada com o uso de microscópio de fluorescência, no qual foram identificadas como leveduras viáveis as células fúngicas marcadas em verde (CALICH; PURCHIO; PAULA, 1979). As células

fúngicas tem a propriedade de acumular fluoresceína (fluocromasia), por outro lado quando estas células encontram-se com suas paredes danificadas, o brometo de etídio penetra rapidamente formando um complexo vermelho fluorescente ao se ligar ao DNA. Sendo assim, a viabilidade ideal de leveduras para experimentação foi considerada quando aproximadamente 80% das leveduras eram DAF positivas.

3.5. Animais experimentais e infecção com Pb18

Nesse trabalho, foram realizados experimentos *in vivo* e/ou *in vitro* utilizando camundongos machos da linhagem C57Bl/6 (WT), assim como camundongos desse mesmo background genético *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-}. Os animais foram obtidos no biotério do Centro de Criação de Camundongos Especiais e Serviço de Biotério-USP, pesando entre 18 a 22g, e ficaram no biotério dos departamentos de Imunologia e Bioquímica e Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, onde foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22° a 25°C) sob condições livres de patógenos e criados com água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP (005/2018). Para realização da infecção, camundongos machos entre 6 e 8 semanas de idade foram infectados via intravenosa (plexo orbital) com 100 µL de solução contendo 1x10⁶ de leveduras viáveis de Pb18. Os experimentos foram realizados utilizando no mínimo 4 animais por grupo.

3.6. Recuperação de fungos e contagem de unidade formadoras de colônia (CFU)

Fragmentos do pulmão foram retirados dos camundongos infectados com *P. brasiliensis* nos dias 7, 15 e 30 dias após infecção. Posteriormente, estes órgãos foram pesados e homogeneizados em 1mL de solução inibidora de protease (Complete®, Rocher, Mannheim, Alemanha) com o auxílio do triturador de tecido (IKA® - Werk; Deutshchland Germany). 50µL do homogenato foram diluídos em 450µL de PBS estéril, onde 100µL desta diluição foi semeada em placas de Petri estéreis contendo meio BHI-ágar enriquecido com 96 µg/mL de gentamicina e 5% de soro bovino fetal e 5g de D(+) Glicose Anidra (C₆H₁₂O₆) (MERK). As placas foram mantidas em estufas com temperatura média de 36°C durante um período de 10 dias e a recuperação de fungos viáveis determinada através da contagem de unidades

formadoras de colônia (CFU). Os valores foram expressos por grama de tecido (CFU/ grama de tecido)

3.7. *Obtenção do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)*

Lóbulos de pulmão foram coletados em tubos criogênicos contendo 1mL de solução inibidora de protease (Complete®, Rocher, Mannheim, Alemanha) foram lisados com o auxílio do triturador de tecido (IKA® - Werk; Deutschland Germany). Este homogenato pulmonar formado foi centrifugado a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C, até o momento da dosagem de citocinas por ELISA.

3.8. *Dosagem de citocinas por ELISA*

A partir do homogenato pulmonar e do sobrenadante de cultura de macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos C57Bl/6, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-}, as concentrações das citocinas (IL-6, IL-23, IL-17, TNF- α) foram mensuradas conforme instruções do fabricante. Placas de poliestireno de 96 poços (Costar, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com tampão de ligação contendo anticorpo de captura (50 μ L/poço) (diluído conforme recomendações do fabricante) e incubados a 4°C *overnight*. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 0,05% de Tween 20® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200 μ L/poço de tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas, como descrito acima, e adicionado aos poços as amostras e os padrões com concentrações específicas (curva padrão). Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, o processo de lavagem se repetiu e foram adicionados em cada poço 50 μ L de uma solução contendo anticorpo biotinilado (diluído conforme orientações do fabricante). Duas horas após incubação, o excesso do anticorpo de detecção foi retirado com sucessivas lavagens e adicionado solução contendo substrato e cromógeno da peroxidase, *tetra-methyl-benzidine* (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, USA). Passando 20 minutos, a reação foi finalizada com a utilização de H₂SO₄ 2N. A detecção e quantificação das amostras foram avaliadas de acordo com a densidade óptica por meio do leitor de ELISA eMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em filtro com comprimento de onda 450 nm. Os resultados foram representados na concentração de picogramas por mililitros (pg/mL).

3.9. Análise histopatológica do pulmão

Para análise histopatológica foi coletado o lóbulo superior esquerdo do pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis* nos dias 7, 15 e 30 após infecção. Estes lóbulos foram fixados em formol tamponado e, após 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70-100%) e clarificados em xilol. Os órgãos foram inclusos em blocos de parafina e cortes de 5 µm de espessura com auxílio do micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados à 60°C para fixação do corte. Em seguida, o material foi lavado com xilol para retirada do excesso de parafina e reidratado com concentrações decrescentes de etanol. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise do processo inflamatório e evolução da resposta granulomatosa, ou pelo método de Gomori para marcação do fungo. Para finalizar, as lâminas já coradas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil) e cobertas com lamínula e analisadas em microscópio óptico comum acoplado à câmera digital (Olympus).

3.10 Imunohistoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi realizada para detecção de IL-17 em cortes histológicos (5µM) de tecido pulmonar dos camundongos C57Bl/6, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} infectados com *P. brasiliensis*. Inicialmente a parafina foi removida dos cortes histológicos, os quais foram hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). A recuperação antigênica foi realizada a 42°C, durante 30 minutos, utilizando tampão citrato pH 6,0. Em seguida, bloqueamos a peroxidase endógena do tecido através da incubação das lâminas com PBS-H₂O₂ 3%, depois de 30 minutos de incubação a lâmina foi lavada 3 vezes com PBS em intervalos de 3 minutos para marcação do anticorpo primário (IL-17) diluído 500 vezes em PBS BSA 1%. Após aplicação do anticorpo primário, os cortes permaneceram por 90 minutos em câmara úmida à temperatura de 37°, sendo posteriormente lavada e aplicado o anticorpo secundários biotinilado (Vector laboratories) por 30 minutos. Passado o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o complexo avidina-biotina peroxidase por 45 minutos à temperatura ambiente e a reação foi revelada através da utilização do substrato diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories). As lâminas foram contra – coradas com hematoxilina por 3 minutos, lavadas com água corrente por 10 minutos e desidratada (álcool 80%, álcool 90% e xilol por 3 minutos cada) e montadas com Bálsamo de Canadá (Vetex Química, Rio de Janeiro, Brasil).

3.11. Extração de RNA total de tecido pulmonar

Lóbulos pulmonares foram retirados dos camundongos WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} infectados ou não infectados por *P. brasiliensis*, e armazenados em à -70°C em Trizol[®] (Life Technologies, Gaithersbrug, MD, EUA). Para extração do RNA, trituramos o tecido com auxílio de uma haste de trituração autoclavada e tratada com dimetilpirocarbonato (DEPC), para degradação de RNA. Ao homogenato foi adicionado 1 mL de trizol e 200 µL de clorofórmio. Após centrifugação (12000 g, 15 minutos a 4°C), a fase aquosa contendo o RNA foi retirada cuidadosamente, transferida para outro tubo com 200 µL de etanol 95% e para purificação do RNA foi utilizado kit SV total RNA Isolation System (Promega, Madision, WI, USA).

Essa mistura foi posteriormente transferida para uma coluna com membrana de sílica acoplada a um tubo coletor e centrifugada à 12000g por 1 minutos à temperatura (TA). Em seguida, foram adicionados 600 µL de solução RNA Wash solution (Promega) e centrifugado à 12000g por 1 minuto à TA. O líquido centrifugado foi descartado do tubo coletor e então, adicionado a solução (Doasse I e o MgCl₂) diretamente sobre o centro da membrana para incubação da DNase. Após 15 minutos, a DNase foi inativada com adição de 200 µL de DNase stop solution (Promega) e centrifugada à 12000 g por 1 minuto à TA. Após sucessivas lavagens utilizando 600 µL da solução RNA Wash Solution, os tubos coletores foram trocados por tubos de eluição, onde foram adicionados 100 µL de água livre de nucleasse diretamente sobre a membrana para eluição do RNA. O RNA foi quantificado a 260nm de absorbância (A₂₆₀) em NanoDropTM 1000 Spectrophometer V 3.7.1 (Thermo Scientific) e armazenado a -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.12. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Após padronização das amostras de RNA em 50 ng/µL, foi adicionado uma mistura contendo 10x RT Buffer, 25x dNTP Mix (100mM), 0,05µg/µL de Oligo (dT) a 50µM, MultiScribeTM Reverse Transcriptase. Essa mistura, foi colocada no termociclador (Modelo PTC-100, M Research, Watertown, MA, EUA). As temperaturas e os tempos de incubação foram ajustados em 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 10°C até a retirada da amostra. Para finalizar, a mistura foi diluída em 180µL de água livre de endonucleases e quantificada por leitura em

NanoDropTM 1000 Spectrophotometer V 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific) antes de ser armazenada à -20°C.

3.13. Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

A análise relativa dos níveis de transcritos gênicos foi realizada no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6, *Nod2^{-/-}* e *Rip2^{-/-}* infectados por *P. brasiliensis* no sétimo e décimo quinto dia após infecção, utilizando-se o sistema SYBR Green e o aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Esse sistema realiza reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras através da utilização de nucleases fluorogênicas, onde a expressão é calculada com base no controle endógeno (gene β -actina, constitutivo). Iniciadores adequados para tais reações, também conhecido como *primers*, foram criados a partir do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), e suas sequências estão listadas na **tabela 1**.

A reação foi realizada preparando uma mistura contendo 7,65 μ L de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 0,5 μ L de cada primer (senso e antisenso) e 1,35 μ L de água livre de endonuclease. Esta solução foi adicionada a cada 5 μ L de cDNA por amostra. A amplificação das sequências dos genes alvos e controle interno (β -actina) foi avaliada através da curva exponencial de amplificação após incubação da amostra à 50°C por 2 minutos, a 95°C por 2 minutos (para desnaturação), 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos (para anelamento das sequências iniciadoras), e para finalizar, 72°C por 30 segundos. A positividade das reações foi determinada baseando-se em controles negativos, não infectados. Os resultados foram analisados com base no valor da linha de corte CT (quantification, Cycle), definido após o término da reação como o ponto correspondente ao número de ciclos necessários para a detecção da expressão do fator avaliado. O resultado foi calculado inicialmente com os valores obtidos do Δ Ct, sendo que Δ Ct = média do Ct gene de interesse – média do Ct gene controle. A expressão relativa, que significa o número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro comparado com o controle foi definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Sendo o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ da amostra – ΔCt da amostra controle.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real.

SEQUÊNCIAS		
Gene	Senso	Antisenso
<i>IL-6</i>	TTCCTACCCCAATTTCCAAT	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
<i>IL-23p19</i>	AATGTGCCCCGTATCCAGTCGT	GGCTCCCCTTTGAAGATGTCA

3.14. Diferenciação de macrófago a partir da medula óssea

Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea (BMDMs) foram utilizadas para experimento *in vitro*. As células precursoras foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbia de camundongos C57BL/6, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-}, cultivadas em meio RPMI 10/30 composto por 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 30% do sobrenadante do cultivo de células L929 (LCCM), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), conforme protocolo descrito por (WARREN e VOGEL, 1985), com algumas modificações. Resumidamente, camundongos foram eutanasiado e seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos, tiveram suas epífises seccionadas em ambiente estéril e as medulas lavadas em meio de cultura RPMI incompleto utilizando seringa com agulha 13 x 4,5 mm estéreis. As células adquiridas foram lavadas e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos, onde o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi incubado com tampão de lise por 1 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente adicionado 10 mL de PBS para retardar a reação e iniciando um novo ciclo de centrifugação por 10 minutos após a adição de meio de cultura RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, as células precursoras foram cultivadas em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino e 30% de LCCM e distribuídas em placas de cultura do tipo Optilux (BD Biosciences), de modo que o volume final por placa utilizada foi de 10 mL (1 fêmur=2placas). Após 4 dias de cultura, um total de 10 mL de meio R10/30 foi adicionado a cada placa e no sétimo dia, as células foram removidas pela lavagem das monocamadas de macrófagos com PBS gelado contendo 0,02% de EDTA. Foram plaqueados 2x10⁵ de macrófagos em placas de 96 poços juntamente com 1x10⁶ de leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 48 horas de incubação, o sobrenadante foi utilizado para dosagem do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α).

3.15. Isolamento dos leucócitos pulmonares

Lóbulos pulmonares esquerdos de camundongos selvagens e geneticamente modificados, foram coletados nos dias 3, 7, 15 e 30 após infecção por *P. brasiliensis*. Os lóbulos coletados foram fragmentados com uma tesoura estéril e postos em tubos de microcentrifuga contendo 1 mL de meio RPMI-1640 incompleto, 2 mg/mL de colagenase I (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 1 mg/mL de DNase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 45 minutos a 37°C. Após este período, os fragmentos restantes foram macerados e passados através de filtros de 50 µm (Filcon, Falcon products) e a suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de tampão de lise para eliminação de hemácias. Após 1 minuto, as células foram lavadas com 10 mL de PBS, centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de RPMI-1640 incompleto. Foi feita uma alíquota das células com diluição de 100 vezes em azul de Tripán e a contagem de leucócitos realizada na câmara de Neubauer. Posteriormente, foi separado 1×10^6 de células para marcação de células mielóides e 2×10^6 para marcação de células linfóides. Para marcação intracelular das células linfóides para citometria de fluxo, 2×10^6 células foram cultivadas por 4 horas a 37°C em placas de 48 poços sob estímulo de 50 ng/mL de PMA (Abcam, Cambridge, MI, UK), 500 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e brefeldina A (BioLegend, San Diego, CA, EUA).

3.16 Citometria de fluxo

Além da determinação das células pelos marcadores extracelulares para identificação monócitos, neutrófilos e linfócitos, as células linfóides foram analisadas por citometria de fluxo segundo marcações de citocinas intracelulares, no intuito de caracterizar a população de linfócitos T em leucócitos recuperados do pulmão (3°, 7°, 15° e 30° dia de infecção) de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Para tal fenotipagem, avaliamos os subtipos celulares de acordo com a expressão das moléculas: CD3, CD4, CD8, CD45, TCR γ/δ , CD11b, CD11c, Ly6C, Ly6G e IL-17. Brevemente, as células separadas para marcação intracelular que foram estimuladas com PMA (acetato de formol miristato), ionomicina e brefeldina, durante 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, foram submetidas à fixação com PBS-formol 2% por 11 minutos, lavadas e permeabilizadas com tampão contendo soro fetal bovino a 1% (Gibco), saponina a 0,5% (Sigma-Aldrich) e azida de sódio a 0,1% (MERCK S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Ao passar 30 minutos de bloqueio das ligações inespecíficas com soro de coelho 10%, anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos foram adicionados,

tais como CD3 conjugado a APC-Cy7, CD4 conjugado a Pacific Blue, CD8 conjugado a PerCP-Cy5, TCR γ/δ conjugado a FITC, e anticorpo para citocina intracelular IL-17 conjugado a PE. Após incubação à 4°C durante 30 minutos ao abrigo da luz, as amostras foram lavadas com PBS, sendo centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto e o *pellet* ressuspensionado em 100 μ L de PBS-formol 1%. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACS CantoII (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ) e as análises foram feitas com o auxílio do programa *FlowJo* (Flow Cytometry Analysis Software v10.0.8.)

3.17. Isolamento de células T naíves e diferenciação para Th17 *in vitro*.

Linfonodo e baços foram retirados de camundongos (C57Bl/6, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-}), sendo os mesmos processados em *cell strainer* (100 μ m) com auxílio do êmbolo de uma seringa estéril de 3 mL em RPMI incompleto. Foi adicionado tampão de lise, adicionado PBS após um 1 minuto e submetido a centrifugação (450g, 8 minutos, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e as células lavadas duas vezes com RPMI incompleto, seguido de centrifugação (450g, 8 minutos, 4°C). As células foram ressuspensionadas em 1 mL de RPMI completo para realização da contagem na câmara de Neubauer. Em seguida, pelo método de separação de células por coluna magnética (AutoMACS Pro Cell Separator) as células foram incubadas com o kit para separação de linfócitos T CD4⁺ (anticorpos anti-CD11b, CD11c, Gr-1, CD19 e CD8) por 15 minutos, que irá marcar as células que não são CD4⁺, realizando assim uma seleção negativa dessas células, e posteriormente incubação com anticorpo anti-biotina por 10 minutos. Após este período de incubação, as células foram centrifugadas (450g, 5 minutos, 4°C), ressuspensionadas em 500 μ L de PBS e levadas a coluna de separação magnética (MACS-Miltenyi Biotec) para retenção das células negativas para CD4. Após obtenção dos linfócitos CD4⁺, estes foram centrifugados e marcados com anticorpo biotinilado anti-CD25 para retenção apenas dos linfócitos CD4⁺ ativados. Após 10 minutos, as células foram centrifugadas e incubadas com *beads* anti-biotina sob as mesmas condições descritas acima. Depois disso, as células foram centrifugadas (450g, 5 minutos), ressuspensionadas em 500 μ L de PBS e passadas novamente através da coluna de separação magnética (MACS-Miltenyi Biotec). Após separação das células, foi realizada a marcação com anticorpo anti-CD4 e anti-CD25, para avaliar a qualidade da separação por citometria de fluxo. Nos experimentos realizados a pureza dos linfócitos TCD4⁺ *naive* foi maior que 90%.

Para diferenciação dos linfócitos CD4⁺ *naíves* em Th17, as células primeiramente foram deixadas em cultura contendo RPMI completo (10% soro bovino fetal, 10.000 unidades de

penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina, 250 µg/mL de antotéricina B, 275 nM de β-mercaptoetanol e 200 mM glutamina), com estímulos para proliferação celular (anti-CD3 e anti-CD28 BD Biosciences – 1 µg/mL) por 96 horas, à temperatura de 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, foram adicionados 2,5 ng/mL de TGF-β e 20 ng/mL de IL-6 (citocinas polarizantes para a diferenciação de linfócitos Th17). Em seguida, foi realizado o protocolo de marcação intracelular para IL-17A e marcação para viabilidade celular.

3.18. Análise estatística

As análises dos resultados foram feitas com auxílio do *GraphPadPrism* (GrandPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo apresentados através da média ± desvio padrão (SD). As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se o teste *t* de *Student*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, para amostras com destruições normais. Foram considerados estatisticamente significativas as diferenças que apresentam valores de P igual ou menor a 0,05.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. A deficiência do receptor NOD2 aumenta a resistência a PCM experimental

Com o objetivo de avaliar a importância do receptor NOD2 durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*, os camundongos WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} foram infectados com 1×10^6 de leveduras viáveis de Pb18. A escolha de camundongos deficientes para a molécula adaptadora *Rip2*^{-/-} teve por objetivo compreender se o mecanismo seria de fato dependente somente do receptor ou também por sua sinalização. Sendo assim, nos dias 7, 15 e 30 após a infecção (dpi), nós coletamos um lóbulo dos pulmões para avaliar as unidades formadoras de colônia (CFU) e observamos que os camundongos *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} apresentaram menor quantidade de fungo quando comparado ao animal WT (**Figura 2A**), sendo confirmado *in situ* pela coloração de Grocott (**Figura 2B**).

Figura 2. O receptor NOD2 contribui para susceptibilidade do hospedeiro contra o fungo *P. brasiliensis*. (A) Camundongos WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} foram infectados com 1×10^6 de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* e a quantificação do fungo no pulmão foi realizada nos dias 7, 15 e 30 pi. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. (*) $p < 0.05$, por múltiplas comparações entre os grupos. (B) O fungo *P. brasiliensis*, também foi identificado no pulmão dos camundongos WT e *Nod2*^{-/-} após coloração do tecido pelo método de Grocott (aumento de 100x e 200x), nos dias 7 e 30 pi.

4.2. Ausência do receptor NOD2 interfere na formação do granuloma

Sabendo-se que para resistência contra à infecção com o *P. brasiliensis* é necessário a formação de granulomas compactos e bem formados (FORTES et al., 2011), nós analisamos a estrutura destes a partir de cortes histológicos dos pulmões, corados com hematoxilina e eosina, de camundongos infectados com *P. brasiliensis* nos dias 7, 15 e 30 pi. Diferente dos camundongos WT e *Rip2*^{-/-} que apresentaram maior quantidade de granuloma, nós notamos que os camundongos *Nod2*^{-/-} exibiram menor número de granulomas, no entanto mais organizados e com presença maciça de leucócitos na parte interna dos mesmos (**Figura 3A-C**).

Levando em consideração que a produção de TNF- α é essencial para formação dos granulomas (EHLERS, 2005), nós avaliamos se a ausência do receptor NOD2 influencia na produção de TNF- α por BMDC infectados por *P. brasiliensis*. Desta forma, BMDC provenientes de WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} foram infectados, numa proporção de 5 leveduras viáveis para cada célula. Os resultados mostraram que não houve diferença na produção de TNF- α pelos leucócitos das diferentes linhagens de animais (**Figura 4A**). O mesmo fenômeno foi observado durante análise *in vivo*, onde mensuramos tal citocina no homogenato pulmonar dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} infectados com 1×10^6 de *P. brasiliensis* 15 dpi (**Figura 4B**). Nossos dados demonstraram que a ausência do receptor NOD2 não interfere na produção de TNF- α durante infecção com *P. brasiliensis*.

Figura 3. Camundongos deficientes de NOD2 apresentam granulomas compactos durante a PCM experimental. Lóbulos pulmonares foram fixados com formalina, adicionados em parafina e posteriormente corado com H&E para análise patológica das lesões granulomatosas dos camundongos WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} infectados com 1×10^6 de células leveduriforme de *P. brasiliensis*. As imagens foram obtidas no aumento de 40x e 400x e no tempo de 7(A), 15(B) e 30(C) dpi.

Figura 4. A ausência do receptor NOD2 não interfere na produção de TNF- α durante desafio com Pb18 in vitro em BMDC e infecção experimental in vivo. (A) 2×10^5 de BMDC provenientes dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} foram cultivados na presença de meio, MDP (10 μ g/mL) ou desafiados com leveduras viáveis de Pb18 (MOI 5) durante 48h. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem de TNF- α por ELISA. (B) Os camundongos WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} machos com idades entre 6-8 semanas, foram infectados com 1×10^6 de *P. brasiliensis*. Após 15 dias da infecção, TNF- α foi mensurado a partir do homogenato pulmonar. (*) $p < 0.05$, deficientes versus WT.

4.3. A ausência do receptor NOD2 resulta no aumento da expressão e produção de IL-6 e IL-23 durante infecção por *P. brasiliensis*.

Como observado anteriormente, a ausência do receptor NOD2 em camundongos infectados com *P. brasiliensis* concretiza resistência frente a infecção e induz a formação de granulomas compactos bem delimitados, porém, esse fenômeno ocorre sem interferência na produção de TNF- α . Não obstante, nosso grupo de pesquisa descobriu recentemente, que a ausência das citocinas IL-6 e IL-23, importantes para diferenciação de Th17, também são essenciais para formação do granuloma paracoccidióidico durante infecção experimental em camundongos (TRISTÃO et al., 2017). Desta forma, fomos avaliar a expressão gênica e síntese dessas citocinas durante PCM experimental.

Nossos resultados revelaram que a ausência da molécula NOD2 nos camundongos infectados com *P. brasiliensis*, após 7 e 15 dias de infecção tiveram um aumento significativo na expressão gênica das citocinas IL-6 e IL-23, porém o mesmo não aconteceu na ausência da molécula adaptadora RIP2 (**Figura 5A**). Adicionalmente, o nível proteico de IL-6 e IL-23 dos animais *Nod2*^{-/-} obtiveram uma elevada produção de IL-6 nos dias 7 e 15 pi e IL-23 no sétimo e trigésimo dia após infecção (**Figura 5C-D**). Entretanto, nenhuma diferença foi observada nos camundongos *Rip2*^{-/-}. Todos os achados citados resultaram em diferenças significativas, corroborando com os resultados da expressão gênica. Sendo assim, esses dados nos sugerem que a presença do receptor NOD2 module negativamente a produção de IL-6 e IL-23 durante a PCM experimental.

Figura 5. A produção de IL-6 e IL-23 é modulada negativamente na presença do receptor NOD2 durante PCM experimental. A expressão relativa foi calculada através da comparação entre os níveis de mRNA dos grupos infectados e não infectados após serem normalizadas pelo gene endógeno β 2-microglobulina. A expressão relativa dos genes IL-6 e IL-23 foi determinada por qPCR no tecido pulmonar dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} no 7º e 15º dpi (A). Dosagem de IL-6 (C) e IL-23 (D), em amostras de homogenato de pulmão dos camundongos selvagens e geneticamente modificados dos dias 3, 7, 15 e 30 após infecção intravenosa por 1×10^6 de *P. brasiliensis*, e dos não infectados (naives) (B). Os resultados são representativos de dois experimentos distintos. O símbolo (*) significa diferença estatística em entre os grupos comparados, onde $p < 0.05$.

4.4. Camundongos deficientes para NOD2 apresentam aumento na produção de IL-17 por células T gamma-delta ($\gamma\delta$) e CD4+ durante infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Partindo do pressuposto que a infecção fúngica induz uma resposta inflamatória mediada pela IL-17, essencial para resistência do hospedeiro durante a PCM experimental e outros tipos de micose (CONTI; GAFFEN, 2010; TRISTÃO et al., 2017), nós decidimos investigar se a ausência do receptor NOD2 interferiria na produção de IL-17 durante infecção com *P. brasiliensis*. Primeiramente, nós dosamos a proteína IL-17 a partir do homogenato pulmonar dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} infectados com 1x10⁶ de leveduras de Pb18 após 7, 15 e 30 de infecção. Na **Figura 6A**, observa-se que nos animais deficientes de NOD2 a produção de IL-17 foi aumentada no sétimo e décimo quinto dia após infecção. Confirmando os dados da **Figura 6A**, podemos observar por imunohistoquímica no tecido pulmonar que no período 7dpi e 15dpi, animais *Nod2*^{-/-} apresentam qualitativamente uma elevada produção de IL-17 quando equiparados com WT (**Figura 6B**)

Figura 6. A ausência do receptor NOD2 intensifica a produção de IL-17 desencadeada pela infecção por *P. brasiliensis*. A quantificação de IL-17 foi mensurada por ELISA a partir do homogenato pulmonar dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} desafiados por 7, 15 e 30 dias com 1x10⁶ de leveduras Pb18 (A). Pela técnica de imunohistoquímica foi identificada a produção de IL-17 nos cortes histológicos (5μm) do pulmão dos camundongos WT e *Nod2*^{-/-} nos dias 7 e 15 pós infecção. Fotomicrografias, aumento 200 vezes. (B). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) p<0,05.

Por citometria de fluxo e utilizando a estratégia de gate proposta na **Figura 7A**, fomos identificar os linfócitos produtores de IL-17. Inicialmente, quando analisamos os linfócitos produtores de IL-17 (CD3+ IL-17+), em geral, notamos que os animais *Nod2*^{-/-} apresentavam estes linfócitos em maior frequência nos dias 3, 7 e 15 pi e em número total no terceiro e sétimo dpi quando comparado com os animais WT. Entretanto, no trigésimo dia, a frequência e o número total destas células se equipararam entre os animais infectados (**Figura 7B**). Após este resultado fomos avaliar quais linfócitos estavam produzindo IL-17 no pulmão destes animais. Os camundongos *Nod2*^{-/-} apresentaram maior quantidade de linfócitos TCD4+ produtores de IL-17+ nos dias 7 e 15 pi que os animais WT (**Figura 7C**). No entanto, quando avaliamos os dias 3 e 7 evidenciamos que a principal fonte de IL-17 dentre os linfócitos CD3+ não seriam das células CD4+ neste período de tempo. Sendo assim, sabendo que os linfócitos T $\gamma\delta$ são as principais células produtoras de IL-17 em infecções agudas no pulmão, decidimos investigar a sua incidência no período inicial da PCM (CHIEN; ZENG; PRINZ, 2013). Nós identificamos que os linfócitos T $\gamma\delta$ IL-17+ estavam em maior número nos animais *Nod2*^{-/-} no 3 e 7 dpi quando comparados com os animais WT (**Figura 7D**). Sendo assim, nós sugerimos que a ausência do receptor NOD2 os linfócitos T CD4+ e $\gamma\delta$ na fase aguda da PCM experimental.

Figura 7. Animais deficientes de NOD2 têm maior quantidade de linfócitos TCD4+ e Tγδ produtores de IL-17 na fase inicial da PCM experimental. (A-D). Leucócitos isolados do pulmão dos camundongos WT, $Nod2^{-/-}$ e $Rip2^{-/-}$ infectados durante 3, 7, 15 e 30 dias com 1×10^6 *P. brasiliensis* foram marcados com anticorpos anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-Tγδ e anti-IL-17 para análise por citometria de fluxo. (A) Os dot-plots exibem a estratégia de gate utilizada. Frequência e número absoluto dos linfócitos CD3+IL-17+ (B), CD4+IL-17+ (C) e γδ+IL-17+ (D). A porcentagem e o número absoluto das células caracterizadas foram representadas por gráficos de barras. A análise estatística considera a média dos animais de cada grupo comparados com o controle WT, onde (*) $p < 0,05$. Os resultados são representativos de dois experimentos.

4.5. O receptor NOD2 no linfócito CD4⁺ regula de maneira intrínseca a diferenciação de Th17.

Nosso próximo passo foi identificar se a alteração do perfil da resposta Th17 apresentada nos camundongos deficientes de NOD2 estava relacionada à falta da molécula NOD2 nos linfócitos. Estudos recentes demonstraram que molécula adaptadora RIP2 regula a diferenciação dos linfócitos CD4⁺ em Th17 (SHIMADA et al., 2018). Sendo assim, a partir das células dos linfonodos e baço dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-}, foram isolados linfócitos TCD4⁺ *naives* por meio de seleção positiva em coluna imunomagnética para avaliar a diferenciação de Th17. Essas células foram cultivadas com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de TGF- β e IL-6 durante 4 dias e posteriormente foi avaliada a sua diferenciação através da citometria de fluxo. Após análises, nós identificamos que os linfócitos deficientes de NOD2 e RIP2 apresentaram maior diferenciação de Th17 quando comparados com as células provenientes dos animais WT (**Figura 8A-B**). Desse modo, nós sugerimos que a molécula NOD2 exerce um papel intrínseco nos linfócitos TCD4⁺ o qual interfere regulando negativamente a sua polarização em Th17.

Figura 8. Células TCD4⁺ *naives* ausentes da molécula NOD2 tem polarização acentuada para o perfil Th17. (A-B) Os linfócitos T CD4⁺CD25⁻ *naives* foram obtidos a partir de linfonodos periféricos e baço dos animais WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} purificadas por coluna imunomagnética. O grau de pureza foi obtido após purificação por citometria de fluxo com a utilização de anticorpos monoclonais específicos para CD4 e CD25. Posteriormente as células foram cultivadas na concentração inicial de 1x10⁵ células/poço na presença de 1 μ g/mL de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 para estímulos, além das citocinas recombinantes TGF- β (2,5ng/mL) e IL-6 (20ng/mL). Após 4 dias de cultura, a porcentagem de diferenciação celular de Th17 foi obtida por citometria de fluxo com os anticorpos: CD4 e IL-17. (A) Os dot-plots exibem o resultado representativo da porcentagem de linfócito Th17 determinada por citometria de fluxo. O gráfico de barra (B) demonstra a frequência das células Th17 após experimento *in vitro*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) p<0,05.

4.6. Camundongos deficientes para NOD2 apresentam aumento de neutrófilos no pulmão durante a fase aguda da infecção experimental com *P.brasiliensis*.

Para a proteção do hospedeiro contra infecções fúngicas é necessário a ação de células da imunidade inata, tais como neutrófilos e monócitos. Estas células utilizam de diversos mecanismo antimicrobianos, como a fagocitose, enzimas granulocíticas, produção de ROS e NETs para eliminação ou contenção do fungo (MEJÍA et al., 2015). Foi demonstrado que os neutrófilos humanos são importantes para resistência do hospedeiro contra *P.brasiliensis* devido à alta atividade de NADPH, peroxidase endógena e fosfatase ácida (DIAS; FILGUEIRA; DE SOUZA, 2004). Concomitantemente aos dados anteriores no qual foi demonstrado um aumento inicial na produção de IL-17 (**Figura 6A**) nos animais *Nod2*^{-/-}, a qual é responsável por induzir a produção e recrutamento de neutrófilos via indução de G-CSF e IL-8 respectivamente, o próximo passo foi analisar a população de neutrófilos no pulmão após infecção com 1x10⁶ de leveduras viáveis de *P.brasiliensis*. Utilizando a estratégia de gate proposta e descrita na **Figura 9A**, nós demonstramos que os animais *Nod2*^{-/-} apresentaram maior infiltrado de neutrófilos no pulmão durante a fase inicial da infecção (3dpi). No entanto, a quantidade de neutrófilos igualou-se entre os grupos no dia 7 pi e posteriormente ocorreu uma redução dessas células nos animais *Nod2*^{-/-} quando comparado aos animais WT 30dpi (**Figura 9B**). Em relação aos animais deficientes da molécula Rip2, nos dias 3 e 7 pi não houve alteração na população de neutrófilos, porém, foi observada uma diminuição no trigésimo dia após infecção em relação ao animal WT. Neste mesmo âmbito, identificamos que a população de monócito estava reduzida nos camundongos ausentes de NOD2 e RIP2 no início e no final da infecção quando comparados aos animais WT (**Figura 9C**). Sendo assim, sugerimos que o recrutamento de neutrófilos e monócitos na ausência do receptor NOD2 é alterado durante a PCM experimental. Enquanto que a falta da molécula RIP2, influencia no recrutamento de monócitos.

A

Figura 9, O recrutamento de neutrófilos e monócitos sofre interferência na ausência de NOD2 durante infecção experimental. (A-C) Camundongos WT, *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} machos entre 6-8 semanas foram infectados com 1×10^6 de leveduras de *P. brasiliensis*. Utilizando a estratégia de gate proposta (A), foi realizada a análise da porcentagem e número absoluto de neutrófilos (Ly6G+) (B) e monócitos (Ly6C+) (C) no tecido pulmonar após 3, 7 e 30 dias de infecção. Ambas as células são CD45⁺ CD11b⁺ e CD11c⁻. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Responsáveis pela identificação de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), os PRR foram classificados quanto a sua estrutura e localização no compartimento celular. Os receptores tipo Toll foram os primeiros a serem descobertos. Desde essa época novas evidências foram esclarecidas dando início a um detalhamento gigantesco sobre a imunidade inata, a qual antes era vista apenas de forma rudimentar. A caracterização dos TLRs forneceu clareza sobre processos moleculares após sinalização dos receptores e conduziram ao longo dos anos para a identificação de diversos tipos de PRRs, dentre eles os receptores da família NLR.

O receptor NOD2 pertencente à subfamília NRLC, que contém o domínio CARD em sua região N-terminal, reconhece o dipeptídeo de muramilo (MDP) encontrado em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Uma vez sinalizado, sofre oligomerização e recruta sua molécula adaptadora RIP2 que exerce a função de ativação das vias inflamatórias mediante NF- κ B e MAPK. Como citado, o receptor NOD2 está envolvido no reconhecimento e desenvolvimento da resposta inflamatória contra bactérias, entretanto estudos recentes veem demonstrando a sua participação na resposta imune contra outros microorganismos não-bacterianos. Foi demonstrado que o receptor NOD2 responde a fita simples de RNA do vírus sincicial respiratório (VSR) usando a molécula adaptadora da mitocôndria MAVS para ativação do fator de transcrição IRF3 para produção de IFN- β (citocina importante para contenção da replicação viral) (SABBAH et al., 2009). Por outro lado, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ativação da via NOD2-RIP2 durante infecção por *Leishmania infantum* modula a produção de citocinas por células dendríticas, levando a indução de uma resposta Th1 e inibindo a polarização para Th17 (NASCIMENTO et al., 2016). Uma vez ausente, o receptor NOD2 ou a molécula RIP2 em camundongos infectados com *L. infantum*, além de serem susceptíveis à infecção apresentaram maior produção de IL-17. Levando em consideração a importância da resposta Th-17 no controle da paracoccidiodomicose (TRISTÃO et al., 2017) e o envolvimento do receptor NOD2 na produção de IL-17 em diversos âmbitos, como na toxoplasmose ocular (DUTRA et al., 2013) e artrite autoimune (NAPIER et al., 2018), nosso grupo utilizou este racional para investigar o papel da molécula NOD2 durante desenvolvimento da PCM. Esta doença é caracterizada como uma micose sistêmica, tipo granulomatosa, que acomete principalmente os pulmões e os tecidos mucocutâneos podendo disseminar via linfo-hematogênica para outros órgãos.

Nossos dados mostram que os animais *Nod2*^{-/-} e *Rip2*^{-/-} são mais resistentes diante infecção com o fungo *P. brasiliensis* tanto no período inicial da infecção como na fase crônica

da doença quando comparados aos animais controle C57BL/6 (**Figura 2**). Esses dados preliminares nos conduziram analisar a reação granulomatosa nos pulmões, cuja responsável pelo controle eficiente da PCM na contenção da proliferação e disseminação do agente infectante para outros órgãos. Durante análise histopatológica, demonstramos que os pulmões dos animais *Nod2*^{-/-} apresentaram granulomas bem delimitados, assim como os animais WT e *Rip2*^{-/-}. No entanto, além de estar em pequenas quantidades e apresentar dimensões reduzidas, os granulomas formados nos camundongos *Nod2*^{-/-} eram mais compactos e continham a presença maciça de leucócitos em sua estrutura interna, fenômeno não identificado nos animais controles (**Figura 3**).

Os granulomas são formados mediante indução de contínuos estímulos antigênicos infecciosos ou não infecciosos, os quais conduzem a produção de diversos fatores que atuam no recrutamento e diferenciação celular (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Foi demonstrado por Roach e colaboradores que a citocina TNF- α durante infecção por *Mycobacterium tuberculosis* é essencial para orquestrar a indução de quimiocinas dando início ao recrutamento de leucócitos, além de auxiliar na agregação destas células nos granulomas funcionais (ROACH et al., 2002). Entretanto, não encontramos diferença na produção de TNF- α nos animais *Nod2*^{-/-} quando comparado aos animais controles (**Figura 4A-B**). Desta forma, acreditamos que a ausência do receptor NOD2 possa estar envolvida na regulação de outra possível citocina envolvida na reação granulomatosa.

Além de seu papel como PRR, o receptor NOD2 foi classificado como regulador negativo das sinalizações induzidas via receptores TLRs. O estudo demonstrou que após a ativação de TLR, o receptor NOD2 regula negativamente a indução de NF- κ B via ativação de IRF4, levando a diminuição da expressão de IL-1 β , IL-6 e IL-12 (UDDEN et al., 2017). O mesmo papel de regulação foi observado no controle da expressão gênica das subunidades IL-12p40 e IL-23p19 (subunidades que formam a IL-23) via microRNA-29 induzido após ativação do receptor NOD2 em células dendríticas humanas (BRAIN et al., 2013). Levando em consideração o estudo publicado por nosso grupo de pesquisa que mostra a importância da produção de IL-6 e IL-23 na formação do granuloma e contenção do *P. brasiliensis* (TRISTÃO et al., 2017), nós acreditamos que o receptor NOD2 possa estar envolvido na produção destas citocinas durante a PCM experimental. Nossos dados evidenciaram um aumento significativo de IL-6 e IL-23 tanto da transcrição gênica como da síntese proteica nas amostras de pulmão dos camundongos *Nod2*^{-/-} infectados com *P. brasiliensis* (**Figura 5**). Sendo assim, acreditamos

que esse resultado pode estar relacionado com a função reguladora do receptor NOD2 evidenciado na literatura.

Como sabido, a resposta imune inata tem extrema importância na ativação da imunidade adaptativa. Após reconhecimento do patógeno pelos PRRs das células apresentadoras de antígenos (APC), geralmente células dendríticas, há o início da resposta inflamatória que conduz a ativação da imunidade adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). O estímulo dos linfócitos T CD4+ *naïves* pelas citocinas TGF- β , IL6, IL-23 dão início a diferenciação para o perfil Th17 (BI; YANG, 2012). Levando em consideração a função dos PRRs na indução da resposta imune adaptativa, nosso grupo demonstrou que a ausência do receptor NOD2 em células dendríticas potencializa a produção de IL-17 nos linfócitos T CD4+ (NASCIMENTO et al., 2016). Neste âmbito, durante infecção com *P. brasiliensis* verificamos que houve uma maior sintetização de IL-17 nos camundongos *Nod2*^{-/-} no sétimo e décimo quinto dia após infecção (**Figura 6**). Durante análise por citometria de fluxo, nossos dados confirmaram que os pulmões dos animais *Nod2*^{-/-} apresentaram linfócitos T CD3+ produtores de IL-17 em maior quantidade quando comparados aos animais WT nos dias 3, 7 e 15 pi (**Figura 7B**). Após este resultado, decidimos identificar a principal fonte de IL-17 dentre os linfócitos.

Durante identificação das células Th17 no pulmão dos animais infectados, observamos que na ausência do receptor NOD2 havia maior quantidade destes linfócitos no sétimo dia pós infecção em relação aos animais WT. No entanto, o total das células Th17 correspondiam a uma pequena porção do número absoluto dos linfócitos CD3+ produtores de IL-17 (**Figura 7C**). Estes dados nos sugeriram que durante a fase inicial do desenvolvimento da PCM, poderia haver outra população de linfócitos responsável pela maior parte da produção de IL-17 no pulmão durante a fase aguda da infecção.

Há pouco tempo acreditava-se que a célula T CD4 (TCR $\alpha\beta$) seria a principal fonte de IL-17 (IVANOV et al., 2006), no entanto, estudos recentes veem demonstrando a participação de outros subconjuntos de células como os linfócitos T $\gamma\delta$, natural *killer* (NK), células NKT e populações de células linfóides inatas (ILCs) na produção desta citocina (PASSOS et al., 2010; SUTTON et al., 2009). Os linfócitos $\gamma\delta$ diferem das células T $\alpha\beta$ principalmente pelo tipo de TCR que constituem e a forma pela qual são ativados. Os TCRs das células T $\gamma\delta$ não reconhecem o complexo MHC-antígeno da mesma maneira que os linfócitos T $\alpha\beta$. Em vez disso, agem como PRRs no reconhecimento de antígenos não proteicos, agindo desta forma de maneira rápida diante sinalização (CROWLEY et al., 1997). Além do mais, foi demonstrado que os linfócitos T $\gamma\delta$ exercem função importante como primeira linha de defesa contra infecção

fúngica (MARTIN et al., 2009). Levando em consideração esses achados, nós conseguimos identificar que a principal célula produtora de IL-17 na fase inicial da PCM nos animais *Nod2*^{-/-} são os linfócitos T $\gamma\delta$ (**Figura 7D**). Desta forma, nossos dados sugerem que o receptor NOD2 pode estar envolvido na produção de IL-17 por linfócitos durante infecção por *P. brasiliensis*. Este fato pode estar envolvido com o aumento da produção de IL-23 na ausência de NOD2, o qual exerce função de potencializar a produção de IL-17 via receptor IL-23R presente nos linfócitos (SUTTON et al., 2009), ou até mesmo, um possível papel regulador de NOD2 nestas células.

Atualmente, estudos vêm demonstrando a participação intrínseca de alguns receptores inatos na polarização de linfócitos T CD4. Juntamente com esta ideia, Bruchard e colaboradores demonstraram que o receptor NLRP3 além de atuar como inflamassoma, exercia a função de fator de transcrição no controle da polarização dos linfócitos Th2 (BRUCHARD et al., 2015). O receptor NOD2, importante no reconhecimento de bactérias intracelulares, embora tenha sido identificado predominantemente em células mielóides, a sua expressão foi detectada em outros tipos celulares como: células endoteliais, células de Paneth e linfócitos T CD4+ (PETTERSON et al., 2011). Quando avaliamos a diferenciação de linfócitos T CD4+ *naives* em Th17 convencional (TGF- β e IL-6), identificamos um aumento significativo na polarização para Th17 na ausência do receptor NOD2 em relação aos linfócitos WT. O mesmo feito não foi observado na ausência da molécula Rip2 (**Figura 8**). Sendo assim, nós sugerimos que a molécula NOD2 possa ter um papel intrínseco na polarização dos linfócitos Th17.

A resposta inflamatória com perfil Th17, além de contribuir para formação do granuloma compacto, também atua de forma indireta no recrutamento de neutrófilos e monócitos (NEMBRINI; MARSLAND; KOPF, 2009). Os sinais induzidos desta citocina em células epiteliais ou mesenquimais, leva ao aumento de expressão de GM-CSF, IL-8 e CCL2, que conduz o recrutamento de neutrófilo e monócito (SHAHRARA et al., 2010). Durante uma infecção fúngica estas células além de atuarem na formação do granuloma, possuem alta atividade fungicida devido sua capacidade fagocítica e produção de reativos de nitrogênio e H₂O₂ (CALVI et al., 2003; GAZENDAM et al., 2016). Em nossas análises, observamos que houve aumento maciço no recrutamento de neutrófilos no período inicial da infecção (3dpi) nos camundongos ausentes de NOD2 quando comparados aos animais WT. No entanto, o número absoluto de neutrófilos sofreu uma diminuição ao decorrer da infecção chegando a ter uma quantidade inferior ao camundongo WT, após 30 dias de infecção (**Figura 9B**). Acreditamos que essa diminuição destas células durante o curso da infecção, tenha acontecido devido ao

controle da replicação fúngica que foi obtida logo no período inicial da infecção, podendo levar a uma diminuição na produção e controle de neutrófilos. Já em relação à população de monócito, primeiramente nós observamos que a quantidade encontrada de monócitos foi muito inferior ao número absoluto de neutrófilos no pulmão. Mesmo assim, a frequência dessas células foi reduzida no pulmão dos camundongos *Nod2*^{-/-} em comparação com os animais WT (**Figura 9C**). Deste modo, deduzimos que durante a paracoccidiodomicose experimental o receptor NOD2 atue na regulação do perfil de resposta imune. Interferindo na funcionalidade dos linfócitos CD4⁺ e T $\gamma\delta$ produtores de IL-17, diferenciação das células Th17 e produção de citocinas importantes para resistência do hospedeiro frente PCM.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados concluímos que a ausência do receptor NOD2 ou da sua molécula adaptadora RIP2 confere resistência durante a PCM experimental. Durante a PCM identificamos que a resistência promovida na falta de NOD2 estava relacionado com o aumento da síntese de IL-6 e IL-23, assim como a produção elevada de IL-17 pelos linfócitos T $\gamma\delta$ na fase inicial da doença. No entanto, a causa que proporciona a resistência na ausência de RIP2 não foi identificada. Sendo assim, nós propomos que a deleção dessas moléculas proporciona o controle da infecção fúngica por *P. brasiliensis*. Entretanto, este fenômeno ocorra de forma distinta, pois não encontramos evidências que possam correlacionar os resultados encontrados na ausência do receptor NOD2 com a falta da sua molécula adaptadora RIP2.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2007.
- ARTHUR, J. C. et al. Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 8, p. 4515–4519, 15 out. 2010.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 209–221, 2008.
- BETHLEM, E. P. et al. Paracoccidioidomycosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 5, n. 5, p. 319–325, set. 1999.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 11 maio 2006.
- BI, Y.; YANG, R. Direct and Indirect Regulatory Mechanisms in TH17 cell Differentiation and Functions: Direct and Indirect Regulatory Mechanisms in TH17 cell. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 6, p. 543–552, jun. 2012.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, jan. 2007.
- BRAIN, O. et al. The Intracellular Sensor NOD2 Induces MicroRNA-29 Expression in Human Dendritic Cells to Limit IL-23 Release. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 521–536, 19 set. 2013.
- BRUCHARD, M. et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 859–870, ago. 2015.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, 1 abr. 1993.
- CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p. 175–177, 28 fev. 1979.
- CALVI, S. A. et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 2, p. 107–113, fev. 2003.
- CANO, L. E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800–806, fev. 1998.
- CASTRO, L. F. DE et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470–485, 1 nov. 2013.
- CHIEN, Y.; ZENG, X.; PRINZ, I. The natural and the inducible: IL-17 producing gamma delta T cells. **Trends in immunology**, v. 34, n. 4, p. 151–154, abr. 2013.
- CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 518–527, jul. 2010.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, out. 2002.

CROWLEY, M. P. et al. The Recognition of the Nonclassical Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Molecule, T10, by the $\gamma\delta$ T Cell, G8. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1223–1230, 7 abr. 1997.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 7, p. 479–489, jul. 2010.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 177–185, fev. 2009.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine, ICIS Awardee Reviews**. v. 74, n. 2, p. 181–189, 1 ago. 2015.

DEMPSEY, P. W.; VAIDYA, S. A.; CHENG, G. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 12, p. 2604–2621, 1 dez. 2003.

DIAS, M. F. R. G.; FILGUEIRA, A. L.; DE SOUZA, W. A morphological and cytochemical study of the interaction between Paracoccidioides brasiliensis and neutrophils. **Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, v. 10, n. 2, p. 215–223, abr. 2004.

DUTRA, M. S. et al. Association of a NOD2 gene polymorphism and T-helper 17 cells with presumed ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 152–163, 1 jan. 2013.

EHLERS, S. Tumor Necrosis Factor and Its Blockade in Granulomatous Infections: Differential Modes of Action of Infliximab and Etanercept? **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. Supplement_3, p. S199–S203, 1 ago. 2005.

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

FORTES, M. R. P. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516–524, jun. 2011.

FRANCO, M. et al. **Pathogenesis of Paracoccidioides brasiliensis granuloma**. Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). Barcelona, JR Prous Science. **Anais...**1988

FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v. 4, p. 185–220, 1989.

FRITZ, J. H. et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 445–459, abr. 2007.

- GAFFEN, S. L. et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 9, p. 585–600, set. 2014.
- GAZENDAM, R. P. et al. How neutrophils kill fungi. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 299–311, 2016.
- GIRARDIN, S. E. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 8869–8872, 14 mar. 2003.
- GODL, K. et al. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15434–15439, 23 dez. 2003.
- GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. Physiological roles of macrophages. **Pflugers Archiv**, v. 469, n. 3, p. 365–374, 2017.
- GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 64, n. 2, p. 477–485, nov. 2013.
- HASEGAWA, M. et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. **The EMBO journal**, v. 27, n. 2, p. 373–383, 23 jan. 2008.
- HUANG, G.; SHI, L. Z.; CHI, H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 161–169, dez. 2009.
- INOHARA, N. et al. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 355–383, 2005.
- INOHARA, N.; NUÑEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 5, p. 371–382, maio 2003.
- IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 22 set. 2006.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, abr. 2015.
- JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. [s.l.] Garland Pub. New York, 2001. v. 2
- JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.
- JIN, H. S.; PARK, J.-K.; JO, E.-K. Toll-like receptors and NOD-like receptors in innate immune defense during pathogenic infection. **Journal of Bacteriology and Virology**, v. 44, n. 3, p. 215–225, 2014.
- KETELUT-CARNEIRO, N. et al. IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 9, p. 4507–4517, 1 maio 2015.

- KOBAYASHI, K. S. et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5710, p. 731–734, 4 fev. 2005.
- KUFER, T. A. et al. Role for erbin in bacterial activation of Nod2. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3115–3124, jun. 2006.
- KUFER, T. A.; SANSONETTI, P. J. NLR functions beyond pathogen recognition. **Nature Immunology**, v. 12, n. 2, p. 121–128, fev. 2011.
- KUROKAWA, C. S. et al. Perfil de virulência de dez isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*: associação com morfologia e padrão genético. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 257–262, out. 2005.
- LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1513–1525, jun. 2004.
- LIPINSKI, S. et al. RNAi screening identifies mediators of NOD2 signaling: Implications for spatial specificity of MDP recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 52, p. 21426–21431, 26 dez. 2012.
- LUTZ, A. Uma micose pseudocócídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Brasil Med**, v. 22, p. 121–4, 1908.
- MAGALHAES, J. G. et al. Nod2-Dependent Th2 Polarization of Antigen-Specific Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 7925–7935, 1 dez. 2008.
- MARTIN, B. et al. Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 321–330, 21 ago. 2009.
- MARTINON, F.; TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 8, p. 447–454, ago. 2005.
- MATTHAEI, K. I.; FOSTER, P. S.; YOUNG, I. G. The role of interleukin-5 (IL-5) in vivo: studies with IL-5 deficient mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 63–68, dez. 1997.
- MCCRACKEN, J. M.; ALLEN, L.-A. H. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. **Journal of Cell Death**, v. 7, p. 15–23, 2014.
- MCDONALD, C. et al. A Role for Erbin in the Regulation of Nod2-dependent NF- κ B Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40301–40309, 12 fev. 2005.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135–145, nov. 2001.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338–344, 2000.

- MEJÍA, S. P. et al. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 1008–1017, 2015.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 237–248, 2008.
- MOHANAN, V.; GRIMES, C. L. The Molecular Chaperone HSP70 Binds to and Stabilizes NOD2, an Important Protein Involved in Crohn Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 18987–18998, 7 abr. 2014.
- MOTA, N. G. S. et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 765–772, 1985.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2017.
- NAPIER, R. J. et al. Nod2 Deficiency Augments Th17 Responses and Exacerbates Autoimmune Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 7, p. 1889–1898, 1 out. 2018.
- NASCIMENTO, M. S. L. et al. NOD2-RIP2–Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 11, p. 1647–1657, 1 dez. 2016.
- NATHAN, C. F. et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, n. 3, p. 670–689, 1 set. 1983.
- NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–611, jul. 2014.
- NAVAS, T. A.; BALDWIN, D. T.; STEWART, T. A. RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33684–33690, 19 nov. 1999.
- NEMBRINI, C.; MARSLAND, B. J.; KOPF, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 986–994; quiz 995–996, maio 2009.
- OGURA, Y. et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4812–4818, 16 fev. 2001.
- OPITZ, B. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 36426–36432, 27 ago. 2004.
- PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 639–665, 2018.
- PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133, nov. 2005.

- PASSOS, S. T. et al. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 4, p. 1776–1783, 15 fev. 2010.
- PATIN, E. C. et al. IL-27 Induced by Select Candida spp. via TLR7/NOD2 Signaling and IFN- β Production Inhibits Fungal Clearance. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 1, p. 208–221, 1 jul. 2016.
- PETTERSON, T. et al. Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors and retinoic acid inducible gene-like receptors in human tonsillar T lymphocytes. **Immunology**, v. 133, n. 1, p. 84–93, maio 2011.
- RAHIGHI, S. et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 1098–1109, 20 mar. 2009.
- RAZZUK, M. A.; URSCHER, H. C.; PAULSON, D. L. Systemic mycoses--primary pathogenic fungi. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 15, n. 6, p. 644–660, jun. 1973.
- RESTREPO, A. The ecology of Paracoccidioides brasiliensis: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323–334, out. 1985.
- RESTREPO-MORENO, A. Ecology of Paracoccidioides brasiliensis. In: **Paracoccidioidomycosis**. [s.l.] CRC Press, 2018. p. 121–130.
- RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection: diagnosis and management**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012.
- ROACH, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 168, n. 9, p. 4620–4627, 1 maio 2002.
- ROMANO, C. C. et al. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, n. 3, p. 149–157, 2002.
- ROSENSTIEL, P. et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 124, n. 4, p. 1001–1009, abr. 2003.
- RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 10, p. 429–436, 1 out. 2007.
- SABBAH, A. et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. **Nature Immunology**, v. 10, n. 10, p. 1073–1080, out. 2009.
- SALZER, H. J. F. et al. Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. **Respiration**, v. 96, n. 3, p. 283–301, 2018.
- SANDERSON, C. J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3101–3109, 15 jun. 1992.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 19 mar. 2010.

- SHAHARRA, S. et al. IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CCL2/MCP-1 induction. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 8, p. 4479–4487, 15 abr. 2010.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, jun. 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 2018.
- SHIMADA, K. et al. T-Cell-Intrinsic Receptor Interacting Protein 2 Regulates Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation. **Immunity**, v. 49, n. 5, p. 873– 885.e7, 20 nov. 2018.
- STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 287–292, 1 jul. 1992.
- SUTTON, C. E. et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 331–341, 21 ago. 2009.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 19 mar. 2010.
- TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: Signal Os that Spur Autophagy and Immunity. **Immunological reviews**, v. 249, n. 1, p. 158–175, set. 2012.
- THEIVANTHIRAN, B. et al. NOD2 signaling contributes to host defense in the lungs against Escherichia coli infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 7, p. 2558–2569, jul. 2012.
- TING, J. P.-Y. et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 285–287, mar. 2008.
- TRISTÃO, F. S. M. et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 21 ago. 2017.
- UDDEN, S. M. N. et al. NOD2 Suppresses Colorectal Tumorigenesis via Downregulation of the TLR Pathways. **Cell Reports**, v. 19, n. 13, p. 2756–2770, 27 jun. 2017.
- WAGENER, J. et al. Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 4, p. e1004050, abr. 2014.
- WAGNER, J. M. et al. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 66–72, jul. 1998.
- WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, 2009.
- WARREN, M. K.; VOGEL, S. N. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 134, n. 2, p. 982–989, fev. 1985.

WATANABE, T. et al. NOD2 downregulates colonic inflammation by IRF4-mediated inhibition of K63-linked polyubiquitination of RICK and TRAF6. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 6, p. 1312–1325, nov. 2014.

WEBER, S. A. T. et al. Dysphonia and laryngeal sequelae in paracoccidioidomycosis patients: a morphological and phoniatic study. **Medical mycology**, v. 44, n. 3, p. 219–225, 2006.

WILLIAMS, G. T.; WILLIAMS, W. J. Granulomatous inflammation--a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, n. 7, p. 723–733, jul. 1983.

ZANELLO, G. et al. Nod2 activates NF- κ B in CD4⁺ T cells but its expression is dispensable for T cell-induced colitis. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e82623, 2013.