UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

KAREN HENRIETTE PINKE

PARTICIPAÇÃO DOS MASTÓCITOS E SEUS RECEPTORES TLR2 E
DECTINA-1 NA DEFESA CONTRA *Candida albicans*: FAGOCITOSE
E PRODUÇÃO/LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E DE PERÓXIDO
DE HIDROGÊNIO

BAURU
2014

KAREN HENRIETTE PINKE

Participação dos mastócitos e seus receptores TLR2 e dectina-1 na defesa contra *Candida albicans*: fagocitose e produção/liberação de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara.

BAURU
2014

P655p Pinke, Karen Henriette
Participação dos mastócitos e seus receptores TLR2 e dectina-1 na defesa contra *Candida albicans*: fagocitose e produção/liberação de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio / Karen Henriette Pinke. – Bauru, 2014.
123 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 009/2012
Data: 21 de maio de 2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu avô Holmes Martins, quem me ensinou o que é amor com um simples olhar. A quem eu me declarava todas as vezes que o encontrava. Quem me fazia sentir orgulho de mim mesma ao ouvir parabéns todas as vezes que ele me perguntava se eu estava estudando. A quem eu não me cansava de ouvir as mesmas histórias de um Homem de 88 anos todos os domingos. Quem me ensinou a fazer palavras cruzadas e jogar tranca. Quem me ensinou que a vida é feita de escolhas e me mostrou com seu orgulho que os estudos me trariam bons frutos, mas ao mesmo tempo e sem querer, me mostrou que toda essa dedicação me tomou grande tempo, no qual hoje, muitas vezes, me arrependo de não ter compartilhado com ele.

Meu avô, você me mostrou o que é o amor de verdade e hoje sei que ele atravessa mundos. Sei que não te perdi e vivo na esperança de te reencontrar. Dedico esta conquista a você que sempre me impulsionou, me valorizou e me prometeu que sempre estaria comigo, em carne ou somente em espírito.

"Existem momentos na vida da gente, em que as palavras perdem o sentido ou parecem inúteis, e, por mais que a gente pense numa forma de empregá-las elas parecem não servir.

Então a gente não diz, apenas sente."

"Atribuído a Sigmund Freud".

Em memória de Holmes Martins

28/06/1925

24/07/2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a *Deus* pela oportunidade de evoluir, aprender e melhorar-me nesta vida. Agradeço pelas boas pessoas que colocastes em meu caminho. Sinto-me lisonjeada ao perceber o verdadeiro amor naqueles que me acompanham. Agradeço também pelas dificuldades encontradas, pois hoje percebo o quanto elas foram importantes para o desenvolvimento do meu caráter. E por todas as vezes que sozinha, não me senti só.

Como não agradecer à família que me acolheu nesse mundo. *Mãe*, tudo que vivemos juntas fez com que juntas evoluíssemos e fortalecêssemos um amor infinito. Você sempre estará comigo e eu sempre estarei com você! Amo-te, incondicionalmente!

Pai, todo o tempo que estivemos separados trouxe-me muitos ensinamentos. Mas, o mais importante resultado disto, foi poder descobri-lo de uma só vez e sentir meu coração inundar com um imenso amor. Quero te ter por mais mil anos! Espelho-me na sua garra durante a minha caminhada.

Mãe e Pai, além de todo o amor, vocês me presentearam com três joias. Um anjo que me olha do céu, um guardião que me guia na Terra e uma fada que ilumina meus caminhos. *Meus irmãos: Magda*, eu estou certa que vigia-nos e intercede por nós. *Luiz Henrique*, com as chatices de um irmão e as responsabilidades de um pai, guiou meu caminho, aconselhando-me e cuidando de minhas escolhas. Sinto-me extremamente feliz quando vejo emanar dos seus olhos lágrimas de orgulho. Meu irmão, eu te amo! *Simone*, uma fadinha mais velha, que mesmo sendo bem crescadinha, guarda os encantos de uma criança. Doce, me acolhe sempre que preciso! Faz-me carinhos, cuida de mim! Dona de um coração cheio de amor! Tata, eu te amo!

Luiz Henrique e Simone, desejo muito ser fruto de um equilíbrio entre vocês; da força e determinação de meu irmão e do imenso coração e sensibilidade da minha tata! Também preciso agradecer os presentes que vocês me deram nesta vida. A *Jéssica*, com quem compartilhei minha infância e depois a maturidade! O *Luiz*, meu gato lindo! Vi crescer e já está se tornando um homem! A *Juliane*, gatinha que só dormia com a titia! Olho pra ti e me vejo! As gêmeas *Lara e Lays* que crescem e continuam como meus nenéns! E por último e

com uma dose extra de carisma, o **Lucas**, que conquistou a todos! **Sobrinhos**, a tia ama muito vocês! Vocês não podem imaginar o quanto!

Agradeço também aos meus queridos tios **Maria Alice**, **Holmes Rodolfo** e **José Richards** por todo o carinho e ajuda que durante a vida dispuseram para mim! Vocês foram e sempre serão importantes na minha caminhada! Agradeço especialmente a Teté por, em muitos momentos, abrir mãos de suas vontades para fazer as de seus sobrinhos!

Ao meu avô **Holmes**, todos os agradecimentos e todo o amor do mundo!

Agradeço à querida **Eva** por sempre me acolher com carinho, desde minha infância e por nos presentear com mais uma linda vida, a **Isabele**, querida irmãzinha que sei que se espelha muito em mim! Espero nunca te decepcionar!

Ao amado **Douglas**. Agradeço muito e de todo meu coração por sempre me dar muito amor e carinho! Agradeço a Deus por ter encontrado você e sua linda família que me acolheu de maneira maravilhosa e a qual hoje chamo de minha família. É com você que faço todos os meus planos. É você o alicerce de minhas lutas. Lindo, te amo muito! Você me equilibra e me ajuda a ser melhor! Você foi um presente lindo, que me deu uma nova família, novos amigos e que, em breve, me dará o presente que tanto anseio, nossos filhos!

Deus, mais uma vez te agradeço. Obrigada pelos presentes lindos chamados **Jack**, **Jacka**, **Dulú**, **Neguinha e Nhônho**. O Homem que não ama os animais, não conhece a forma mais pura deste sentimento. Jackinha, em especial, você me ensinou como a gratidão pode gerar um amor enorme. Te amo filha!

Agradeço a **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** que me acolheu a cerca de 7 anos atrás e me apresentou ao mundo científico. Obrigada por todos os ensinamentos! Agradeço a Deus por ter sido você e a **Patrícia** as pessoas incumbidas de me ensinar os métodos e condutas dentro da Ciência. Mas, agradeço muito mais à **Vanessa**, amiga maravilhosa e irmã de alma. Agradeço à sua família maravilhosa, que me trata com grande carinho e enorme afeição. Sinto que tínhamos que nos conhecer e agradeço por ter sido logo! Como já te disse, não tenho palavras pra descrever o que sinto por você e acredito que o conhecimento que temos neste mundo não me permite compreender. Um dia, hoje, quando escrevo este agradecimento, você me enviou um texto que, pra mim, define a Vanessa professora, mãe, amiga e irmã:

"Não sei se a vida é curta ou longa para nós. Mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido na vida. É o que faz com que ela seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

Cora Coralina

À mais que querida **Patrícia**! Pati, eu e você compartilhamos muitos momentos, os quais foram e sempre serão extremamente importantes pra mim! Você me mostrou a luz no fim do túnel. Fez-me acreditar em mim mesma e me ajudou a crescer! Pati, você me inspirou e me inspira. Você é um exemplo que quero sempre seguir. Você realmente conquistou um lugar fixo no meu coração. Amiga, quero você sempre junto comigo!

À amiga e irmã **Ana Carolina**. Agradeço a Deus por ter te conhecido e por ter me dado à oportunidade de poder chamar a sua família de minha! O que sinto por você é um grande amor, cuidado, respeito e vontade de fazer com que você seja muito feliz. Amiga, amo você, amo seus pais, a Helô, seus tios, sua família. Vocês fazem eu me sentir especial. Vocês acolheram a mim e o Douglas com grande amor e carinho. Temos certeza que sempre estaremos com vocês vivendo momentos de muita felicidade.

Ao querido amigo e irmão **Heliton**. Agradeço por todas as descobertas, risadas, tensões e dúvidas que vivemos juntos durante todos esses anos. Sinto-me muito feliz por termos compartilhado momentos muito importantes de nossas vidas e por ter certeza que construímos uma relação muito além da vida científica. Você tem residência fixa no meu coração.

À querida amiga **Taiane**, com quem compartilho alegrias, dificuldades e anseios desde a graduação. Tai, que possamos sempre compartilhar nossas vitórias e superações. E que venha o Doutorado!

À especial amiga **Rafaela** por todos os momentos durante nossa graduação, todas as confissões durante o caminho de casa até a UNESP e todas as risadas que demos juntas. Por todas as lamentações, todo o desespero e cansaço compartilhado linha a linha de nossas dissertações. Quero muito que nossos planos deem certo e que possamos dividir mais uma fase de nossas vidas!

Aos queridos amigos **Pepe** e **Agnes** por todas as besteiras, risadas e aflições compartilhadas. Preciso de vocês sempre por perto para descarregar as energias! E viva nossas sextas científicas!

Às queridas **Rafaela, Ana Regina e Flávia** por compartilharmos grandes e diversos momentos. Obrigada por toda a ajuda e pela amizade e carinho!

À **Magda** que muitas vezes me aconselhou como mãe e a quem eu desejo os melhores sentimentos.

Às amigas de graduação **Letícia e Maíra** pelas nossas sessões de desabafo e risadas.

Aos amigos de graduação e de coração **Manolo e Sandro** pelas risadas e apoio. Muito obrigada por estarem sempre presentes e por me ajudarem quando tanto precisei durante o mestrado.

A todos meus outros colegas de graduação, em especial a Aline, Amanda e a Patrícia, com as quais eu mantenho maior contato. Todos fizeram parte de uma das melhores fases de minha vida. Saudades de nossas aulas!

À querida **Ernna**, amizade feita internacionalmente que se manteve em terras brasileiras. Obrigada por trazer às nossas vidas carinho e alegria.

Aos amigos **Ricardo, Dona Lena, Rubia e Karolyn** por todo o apoio e carinho comigo.

Aos queridos **James e Camila** pela amizade, suporte e carinho durante esses anos. Obrigada por eu poder contar com vocês desde a iniciação científica!

Agradeço aos Professores da disciplina de Patologia **Prof. Dr. Alberto Consolaro, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira e Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira** por todos os ensinamentos, todos os momentos de aprendizado e também momentos de descontração que tornaram minha passagem pelo Departamento muito importante e proveitosa.

Agradeço às funcionárias da Disciplina de Patologia **Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Felipe e Marina dos Santos Corrêa** por todo o carinho durante todos

esses anos. Vocês me acolheram como filha. Sou muito grata por tudo e guardo imenso carinho por vocês!

Aos queridos funcionários **André Luís da Silva, Luiz Carlos da Silva e Ovídio dos Santos Sobrinho** por toda a cordialidade e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos **colegas de Pós-graduação** de hoje e todos aqueles que passaram pela minha vida nesses 7 anos, com os quais compartilhei diversos momentos de aprendizado durante essa fase de nossas vidas.

Aos queridos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa **Marcelo Milanda, Márcia Sirlene Zardin Graeff, Neusa Caetano Barbosa, Rafaela Alves da Silva Alavarce e Renato Pereira Murback** e o coordenador **Prof. Dr. Vinícius de Carvalho Porto** por todo o carinho, ajuda e torcida. Sou imensamente grata.

À todos os professores da pós-graduação da FOB-USP pelos ensinamentos e, em especial os professores **Dr. Heitor Marques Honório e Dr. José Roberto Pereira Lauris** por todos os ensinamentos sobre estatística e pela paciência com a minha curiosidade sobre a área.

Às Professoras **Dra. Maria Célia Jamur e Dra. Constance Oliver** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), que abriram as portas de seu laboratório e nos ensinaram muito sobre os mastócitos.

Aos colegas **Daniela e Júnior** por terem nos acompanhado durante as visitas pela FMRP e nos auxiliado durante o desenvolvimento de nossas pesquisas com mastócitos. Grandes parceiros científicos!

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha** por também ter nos recebido na FMRP, nos auxiliado no desenvolvimento de técnicas e por ter viabilizado nossos experimentos com camundongos TLR2^{-/-}.

Ao **Prof. Dr. Fábio Porto Foresti** da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Bauru) que me recebeu em seu laboratório, LAGENPE, e possibilitou que eu finalizasse parte dos protocolos do presente trabalho. Agradeço muito pelo carinho e amizade!

Ao **Prof. Dr. Valdecir Ximenes** da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Bauru) pela gentileza e ajuda com o manuseio do espectrofotômetro.

À **Dra. Maura Rosane Valério Ikoma** por nos receber no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemonúcleo Regional de Jaú e por nos ajudar nessa etapa de nossos experimentos.

À **Profa. Dra. Maria Sueli Parreira** da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Bauru) que sempre me recebeu de braços abertos em seu laboratório, LIPE, e disponibilizou ajuda sempre que necessário. Agradeço-a também por ter me indicado a Profa. Dra. Alexandrina Sartori, com quem terei o prazer de desenvolver meu doutorado.

À **Profa. Dra. Alexandrina Sartori** da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Botucatu) por todo o carinho e atenção que me recebeu em seu laboratório e por ter aceitado participar desta nova etapa da minha vida.

Agradeço a **Universidade Estadual Paulista, campus de Bauru**, por ter me proporcionado uma das fases mais especiais na minha vida e o **Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências** por sempre me receber com braços abertos. Agradeço todos os professores deste departamento por todo o ensino e dedicação.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo** por todo o suporte e oportunidades que tive durante minhas iniciações científicas e meu mestrado. Com certeza, o berço da carreira acadêmica que anseio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo suporte às pesquisas que desenvolvi e por possibilitar que eu expandisse meus horizontes em eventos científicos internacionais.

"Na verdade não sou de forma alguma um homem de ciência, nem um observador, nem um experimentador, nem um pensador. Sou, por temperamento, nada mais que um conquistador - um aventureiro, em outras palavras - com toda a curiosidade, ousadia e tenacidade características desse tipo de homem."

Sigmund Freud

RESUMO

Candida albicans (*C. albicans*) constitui um fungo comum nas mucosas do trato gastrointestinal, incluindo cavidade bucal, que pode ocasionar candidose local ou invasiva, principalmente em estados de imunossupressão. Os mecanismos de defesa contra este fungo podem ser desencadeados pela ligação dos receptores de reconhecimento de padrões, TLR2 e dectina-1, aos seus ligantes, como a fosfolipomanana e os β -glucanos encontrados na parede celular de *C. albicans*. Os mastócitos possuem estes receptores em sua membrana celular e residem nas interfaces com o ambiente, podendo constituir umas das primeiras linhas de defesa. Seus mecanismos imunes incluem síntese e secreção de mediadores, apresentação de antígenos, bem como atividades fagocitária e microbicida. Todos estes mecanismos de defesa podem ser desencadeados de forma independente ou cooperativa entre os receptores TLR2 e dectina-1. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar in vitro a ocorrência de fagocitose, a geração de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio pelos mastócitos desafiados ou não com *C. albicans*, e a participação do TLR2 e dectina-1 nesses eventos. Para isto, mastócitos, diferenciados da medula óssea (BMMCs) de camundongos selvagens (**BMMCs Wt**) ou TLR2^{-/-} (**BMMCs TLR2^{-/-}**) foram desafiados com *C. albicans*. Células eram também bloqueadas in vitro com anticorpos específicos anti-dectina-1 (**BMMCs BD-1** e **BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1**). Os eventos foram analisados por meio de ensaio fluorescente de fagocitose, método colorimétrico de Griess e pelos kits DAF-FM diacetato, Cell Rox Deep e Amplex Red. Os resultados foram expressos através de porcentagem, valores médios e desvios padrão, obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA fatorial, seguido de Fischer. Entre os BMMCs Wt, houve maior taxa de fagocitose com uma maior produção intracelular de NO aos 60 minutos em comparação aos outros tempos. A liberação extracelular de NO foi maior aos 120 minutos em relação aos outros tempos. O número de leveduras fagocitadas aumentou com o tempo, porém com diferença significativa somente entre os tempos de 30 e 120 minutos. Entre os BMMCs TLR2^{-/-}, houve maior número de leveduras fagocitadas aos 60 minutos em comparação aos 120 minutos. Porém, a liberação extracelular de NO foi menor aos 60 minutos em relação aos outros tempos. Comparando-se com os BMMCs Wt, os BMMCs TLR2^{-/-} apresentaram uma redução na taxa de fagocitose, aos 60 minutos, menor liberação de NO extracelular, em todos os tempos, e menor número de leveduras fagocitadas aos 120 minutos. Comparando-se com os BMMCs Wt, os BMMCs BD-1 e os BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 apresentaram uma redução na taxa de fagocitose com uma menor produção intracelular de NO, aos 60 minutos, e menor

liberação de NO extracelular, aos 60 e 120 minutos. Comparando-se com os BMMCs Wt, os BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 apresentaram uma maior produção de NO intracelular, aos 30 minutos, e menor número de leveduras fagocitadas aos 60 e 120 minutos. Sendo assim, concluímos que os mastócitos são capazes de fagocitar *C. albicans* com concomitante produção de substâncias potencialmente candidacidas. Concluímos também que estes mecanismos envolvem o reconhecimento do fungo via TLR2 e dectina-1, principalmente de forma sinérgica.

Palavras-chave: Mastócitos. *C. albicans*. Fagocitose. Óxido nítrico. Peróxido de hidrogênio. Receptores de reconhecimento de padrão.

ABSTRACT

Participation of mast cells and its TLR2 and dectin-1 receptors in defense against *C. albicans*: phagocytosis and production/release of nitric oxide and hydrogen peroxide

Candida albicans (*C. albicans*) is a common fungus present in gastrointestinal tract mucosa including oral cavity, which may cause local or invasive candidiasis, especially in immunosuppression. The mechanisms of defense against this fungus may be triggered by the binding of the pattern recognition receptors TLR2 and dectin-1 to its ligands, such as phospholipomannan and β -glucans found in the cell wall of *C. albicans*. Mast cells express these receptors on cell membrane and reside in the interfaces with the environment, and may be one of the first lines of defense. Their immune mechanisms include synthesis and secretion of mediators, antigen presentation, as well as phagocytic and microbicidal activities. These mechanisms can be triggered independently or cooperatively by TLR2 and dectin-1. Therefore, the aim of the study was to evaluate in vitro the phagocytosis, the generation of nitric oxide and hydrogen peroxide by mast cells challenged or not with *C. albicans*, and the involvement of TLR2 and dectin-1 receptors in these mechanisms. Bone marrow-derived mast cell (BMMCs) from wild type mice (**BMMCs Wt**) or TLR2^{-/-} (**BMMCs TLR2^{-/-}**) was challenge with *C. albicans*. Cells were also in vitro blocked with specific anti-dectin-1 antibodies (**BMMCs BD-1** and **BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1**). The mechanisms were analyzed using fluorescent phagocytosis assay, Griess colorimetric method and by DAF-FM diacetate, CellRox® Deep Reagent and Amplex® Red enzyme assays. Results were expressed by percentage, mean and standard deviations obtained from the least three independent experiments. Statistic was performed using factorial ANOVA and Fischer. Among BMMCs Wt, there was higher phagocytosis rate associated with increased intracellular NO production at 60 minutes, comparing to other periods. The extracellular release of NO was higher at 120 minutes comparing to other periods. The number of phagocytized yeasts increased over time, however with significant difference only among the 30 and 120 minutes. Among BMMCs TLR2^{-/-}, there was higher number of phagocytized yeast at 60 minutes compared to 120 minutes. However, the extracellular release of NO at 60 minutes was lower comparing to other periods. In comparison to BMMCs Wt, the BMMCs TLR2^{-/-} showed a reduction in the phagocytosis rate, at 60 minutes, lower release of extracellular NO, at all times, and fewer numbers of phagocytized yeast at 120 minutes. Compared to BMMCs Wt, the BMMCs BD-1 and BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 showed a reduction in the phagocytosis rate with lower

intracellular NO production, at 60 minutes, and decrease of extracellular NO release, at 60 and 120 minutes. Comparing to BMMCs Wt, the BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 showed increased production of intracellular NO, after 30 minutes, and fewer phagocytized yeast, at 60 and 120 minutes. Therefore, we conclude that mast cells are able to phagocytose *C. albicans* with concomitant production of the potentially microbicidal substances. Also conclude that these mechanisms involve the fungal recognition via TLR2 and dectin-1, especially by means of synergistic way.

Key words: Mast cells. *C. albicans*. Phagocytosis. Nitric Oxide. Hydrogen Peroxide. Receptors, Pattern Recognition.

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
*	Asterisco
#	<i>Hashtag</i>
+	Mais
<	Menor
=	Igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcento
X	Vezes
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BD-1	Bloqueio do receptor dectina-1
BMMCs	Mastócitos derivados de células medulares (<i>bone marrow mast cells</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CD	Agrupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CLR	Receptor do tipo lectina C (<i>C-type lectin receptors</i>)
cm^2	Centímetro quadrado
CO_2	Dióxido de carbono
CTMC	Mastócitos do tecido conjuntivo
Cy5	Cianina 5
DAF-FM	4-amino-5-metilamino- 2', 7'-difluoresceína
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica

<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FC	Fragmento cristalizável das imunoglobulinas
FCεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (<i>granulocyte monocyte colony-stimulating factor</i>)
GSH	Glutathiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	N-(2-hidroxietil) Piperazina-N- (Ácido 2-etanosulfônico)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	NO sintase induzível
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
M	Molar
MCC	Mastócito com somente quimase
MCETs	Armadilhas extracelulares de mastócitos (<i>Mast cells extracellular traps</i>)
MCs	Mastócitos
MCT	Mastócito com somente triptase
MCTC	Mastócito com triptase e quimase
mg/L	Miligrama por litro
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
MMC	Mastócito da mucosa
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N	Normal
NEED	N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride
NF-κB	Fator nuclear-κappa B (<i>nuclear factor-kappa B</i>)
ng/mL	Nanogramas por mililitro
NLR	Receptor tipo NOD
Nm	Nanômetros
NOS2	NO sintase 2
NOS2 ^{-/-}	Depleção da enzima NO sintase 2
P	Valor p estatístico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>phycoerythrin</i>)
PGD2	Prostaglandina D2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI-3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
PLM	Fosfolipomanana (<i>phospholemman</i>)
PMA	Acetato miristato de forbol (<i>phorbol myristate acetate</i>)
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>pattern recognition receptors</i>)
RFU	Unidades relativas de fluorescência (<i>relative fluorescence units</i>)
RNS	Espécies reativas do nitrogênio (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Espécies reativas do oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
Rpm	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
SCF	Fator de células tronco (<i>stem cell factor</i>)
SD	Desvio padrão (standard deviation)
SOD	Superóxido dismutase

TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (<i>T helper</i>)
TLR	Receptor do tipo Toll (<i>toll-like receptor</i>)
TLR2 ^{-/-}	Depleção do receptor tipo Toll 2
TLR2 ^{-/-} /BD-1	Bloqueio de dectina-1 em célula com depleção do receptor tipo Toll 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (<i>tumor necrosis factor- α</i>)
TSB	Caldo de soja triptona (<i>tryptic soy broth</i>)
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina
Wt	Do tipo selvagem (<i>wild type</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	25
1.1	Considerações iniciais	27
1.2	Os mastócitos	28
1.3	Ativação e mecanismos imunes dos mastócitos	29
1.4	Ativação dos mastócitos via TLR2 ou dectina-1	30
1.5	Respostas antimicrobianas dos mastócitos	31
1.6	<i>C. albicans</i> , TLR2, dectina-1 e resposta antimicrobiana	32
2	PROPOSIÇÃO	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Manejo dos animais e obtenção das células medulares	41
3.2	Diferenciação celular in vitro	42
3.3	Manipulação de <i>C. albicans</i> SC5314: crescimento, lavagem e contagem	44
3.4	Bloqueio in vitro do receptor dectina-1	44
3.5	Classificação dos grupos experimentais	45
3.6	Desafio com <i>C. albicans</i> SC5314 e ensaio de fagocitose	46
3.7	Desafio com <i>C. albicans</i> SC5314 e produção intra e extracelular de óxido nítrico	47
3.8	Desafio com <i>C. albicans</i> SC5314 e produção intra e extracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	48
3.9	Análise dos resultados	49
4	RESULTADOS	51
4.1	Caracterização fenotípica/morfológica e viabilidade dos mastócitos obtidos de camundongos selvagens	53
4.2	Fagocitose pelos mastócitos	56
4.2.1	Mastócitos obtidos de camundongos selvagens fagocitaram in vitro zimosan e <i>C. albicans</i>	56
4.2.2	A fagocitose de zimosan e de <i>C. albicans</i> é alterada em mastócitos com bloqueio e ou ausência de receptores dectina-1 e TLR2	58
4.2.3	Número de leveduras de <i>C. albicans</i> fagocitadas por BMMCs é pouco alterado durante os períodos de desafio	61

4.2.4	O bloqueio de dectina-1 em BMMCs TLR2 ^{-/-} interfere significativamente no número de leveduras de <i>C. albicans</i> fagocitadas	61
4.3	Óxido nítrico em mastócitos desafiados com <i>C. albicans</i>	63
4.3.1	Produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs Wt é estimulada por zimosan ou por <i>C. albicans</i> após 60 minutos	63
4.3.2	Interferência nos receptores TLR2 e dectina-1 altera a produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs estimulados	64
4.3.3	<i>C. albicans</i> induz a liberação de óxido nítrico extracelular em BMMCs Wt	70
4.3.4	Estímulos fúngicos não alteram a liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs TLR2 ^{-/-}	71
4.3.5	<i>C. albicans</i> não estimula a liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs bloqueados dos seus receptores dectina-1	72
4.3.6	Na ausência de TLR2 e bloqueio de dectina-1, a liberação de óxido nítrico extracelular por BMMCs não aumenta após estímulos	73
4.3.7	Alterações nos receptores TLR2 e dectina-1 prejudicam a liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs	74
4.4	Peróxido de hidrogênio em mastócitos desafiados com <i>C. albicans</i>	78
4.4.1	Desafio com <i>C. albicans</i> não induz aumento significativo na produção intracelular de H ₂ O ₂ por BMMCs Wt	78
4.4.2	Produção de H ₂ O ₂ intracelular por BMMCs TLR2 ^{-/-} ou BD-1 é significativamente estimulada por zimosan	78
4.4.3	Produção de H ₂ O ₂ intracelular por BMMCs TLR2 ^{-/-} /BD-1 é afetada significativamente pelo estímulo com <i>C. albicans</i> após 120 minutos	80
4.4.4	Produção intracelular de H ₂ O ₂ por BMMCs estimulados com LPS ou zimosan, mas não com <i>C. albicans</i> , é influenciada pelos receptores TLR2 e dectina-1	82
4.4.5	BMMCs não demonstraram liberação de H ₂ O ₂	85
5	DISCUSSÃO	87
5.1	Mecanismos imunes desenvolvidos por mastócitos contra <i>C. albicans</i> : ataque ou defesa?	89
5.2	TLR2 e dectina-1 no processo de fagocitose de <i>C. albicans</i> pelos mastócitos	93
6	CONCLUSÕES	95

REFERÊNCIAS	99
APÊNDICES	109
ANEXOS	121

1 Introdução e
Revisão de Literatura

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Considerações Iniciais

O grande número de casos de candidose na população e o fato de *Candida albicans* (*C. albicans*) ser um fungo oportunista, presente normalmente em simbiose com os humanos, fazem com que o estudo dos mecanismos de defesa contra este fungo seja fundamental para o desenvolvimento posterior de terapêuticas e sistemas de prevenções na população em geral e, principalmente, nos indivíduos com maiores fatores de risco. O papel imunológico dos mastócitos (MCs) foi descoberto recentemente e pouco se sabe sobre sua atuação contra infecções por *C. albicans*. Sendo assim, a avaliação da ocorrência de mecanismos que culminam na morte desses patógenos bem como a caracterização da participação dos MCs e de seus receptores envolvidos no reconhecimento deste fungo são de extrema importância, visto que estas células encontram-se estrategicamente localizadas na interface organismo-ambiente, podendo ser uma das primeiras linhas de defesa na patogenia da candidose.

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra infecções agudas e crônicas atuando através de inúmeras células efetoras. Dentre seus mecanismos, estão a liberação de mediadores, as ações microbidas (dependentes ou não de fagocitose), a apresentação de antígenos, além da manutenção da homeostase via receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* – PRRs). Atuantes nesses diversos processos, os MCs não são apenas considerados, atualmente, como as células responsáveis pelas reações alérgicas (Taylor e Metcalfe, 2001; Marshall e Jawdat, 2004). Fatores como sua localização nas interfaces com o ambiente, sua longa sobrevivência nos tecidos e a habilidade de estocar numerosos imunorreguladores em seus grânulos secretores influenciaram a inclusão dos MCs entre as células efetoras da imunidade (Marshall e Jawdat, 2004; Sur *et al.*, 2007).

1.2. Os Mastócitos

Os MCs são elementos-chave do sistema imune que derivam de progenitores hematopoiéticos da medula óssea (Taylor e Metcalfe, 2001; Sur *et al.*, 2007; Rao e Brown, 2008; Kumar e Sharma, 2010). MCs maduros normalmente não são encontrados na circulação devido aos seus precursores migrarem, ainda imaturos, da medula óssea para os tecidos onde sofrem diferenciação *in situ* (Sur *et al.*, 2007; Rao e Brown, 2008) e adotam um fenótipo determinado pelo microambiente (Sur *et al.*, 2007; Kumar e Sharma, 2010; Moon *et al.*, 2010). Nos humanos, eles variam em forma, têm núcleos arredondados, e o citoplasma contém grânulos ligados à membrana e corpos lipídicos. O conteúdo granular difere conforme o tipo de mastócito e essa heterogeneidade é atribuída a diferenças de proteases, proteoglicanas, citocinas e fatores de crescimento requeridos para sua diferenciação e maturação (Rao e Brown, 2008; Moon *et al.*, 2010). Considerando a presença de diferentes proteases em seus grânulos, podemos classificá-los em células contendo somente triptase que são denominadas de MCT; somente quimase, chamados de MCC, e aqueles que apresentam estes dois tipos de proteases, conhecidos como MCTC. De modo semelhante, em roedores, foram descritos dois subtipos de MCs, aqueles do tecido conjuntivo (CTMC), encontrados na pele e na cavidade peritoneal, e os MCs da mucosa (MMC) que residem principalmente na mucosa dos pulmões e do trato gastrointestinal (Rao e Brown, 2008; Kumar e Sharma, 2010; Moon *et al.*, 2010). Ambos diferem em seus conteúdos granulares e função.

Na imunidade, os MCs atuam no recrutamento de outras células imunes para os sítios de infecção, na apresentação de antígenos e na função de numerosas células como as células dendríticas, células T e células B, fazendo uma ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa (Rao e Brown, 2008; Kumar e Sharma, 2010). A contribuição destas células nesta rede defensiva ocorre de diferentes formas e tem sido demonstrada de forma efetiva contra diferentes grupos bactérias, vírus e parasitas (Malaviya *et al.*, 1994; Dawicki e Marshall, 2007; Lima *et al.*, 2013). Entretanto, são escassos os trabalhos enfocando os mecanismos de defesa dos mastócitos contra fungos (Pagliari *et al.*, 2006; Urb *et al.*, 2009; Yang e Marshall, 2009). Especialmente frente a *C. albicans*, alguns estudos têm relacionado a ativação de mastócitos por este patógeno e o desenvolvimento de doenças alérgicas (Noverr *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006). Em 1974, Nosal *et al.* demonstraram que glicoproteínas isoladas de *C. albicans* induzem a desgranulação de mastócitos e a liberação de histamina (Nosal *et al.*, 1974). Com relação a substâncias antimicrobianas, destaca-se o estudo das

piscidinas, peptídeos catiônicos isolados de mastócitos de alguns peixes que possuem atividade fungicida, principalmente através do dano à membrana de *C. albicans* (Sung et al., 2008).

1.3. Ativação e Mecanismos Imunes dos Mastócitos

Atualmente, sabe-se que a membrana de MCs contém vários receptores/moléculas, dentre os quais o melhor caracterizado é o receptor de alta afinidade para imunoglobulina E (FcεRI), que está associado a processos extensivamente estudados em mastócitos como as reações inflamatórias ligadas a doenças alérgicas (Metcalf, 2008). Ademais, MCs possuem receptores promotores do reconhecimento de diversos microrganismos através da identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes receptores, os PRRs, incluem as lectinas do tipo C (CLRs), receptores de varredura (*scavenger*), receptores semelhantes à NOD (NLR) e receptores tipo Toll (TLR), que podem estar presentes em sua superfície, em vesículas endossômicas e no seu citoplasma. Desta forma, vários patógenos e seus produtos podem ativar os MCs através destes sistemas de receptores podendo desencadear diferentes respostas biológicas nessas células, incluindo atividades fagocitárias e antimicrobianas, bem como a secreção de conteúdo pré-formado e estocado em seus grânulos por um processo regulado de exocitose (histamina, TNF-α, IL-4 E GM-SCF), de mediadores lipídicos (PGD2, LTC4 E LTB4) e de citocinas (IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 E IL-13) (Gilchrist *et al.*, 2003; De Vries e Noelle, 2010; Palker *et al.*, 2010).

Mecanismos microbicidas independentes de fagocitose também são desenvolvidos por este tipo celular, através das armadilhas extracelulares dos MCs (*Mast Cells Extracellular Traps* - MCETs) compostas por DNA, histonas, triptase e peptídeo antimicrobiano LL-37. Essas estruturas são capazes de prender e/ou matar diferentes microrganismos como *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Von Kockritz-Blickwede *et al.*, 2008; Von Kockritz-Blickwede e Nizet, 2009). Ainda, potencializando suas ações imunes, os MCs podem prevenir ou controlar uma possível reinfecção modulando seu fenótipo durante o curso da infecção e reabastecendo seus grânulos durante ou após a sua resolução, fornecendo uma forma de memória imunológica (Abraham e St John, 2010).

1.4. Ativação dos Mastócitos via TLR 2 ou Dectina-1

Os TLRs são proteínas do tipo transmembrana com regiões ricas em leucina e que reconhecem vários componentes microbianos, iniciando assim uma cascata de sinalização que resulta nas respostas imunes inatas e na ligação entre as imunidades inata e adaptativa (Bourke *et al.*, 2003; Bellocchio *et al.*, 2004). Além disso, os TLRs também reconhecem sinais endógenos de dano como células necróticas ou produtos da quebra da matriz extracelular (Kumar e Sharma, 2010). As ações resultantes de sua sinalização dependem do TLR específico que foi ativado e da ocorrência de amplificações pela atuação sinérgica com outros receptores como os CLRs (Novak *et al.*, 2010). Os MCs expressam diferentes tipos de TLRs, mas esta expressão pode ser influenciada pela sua origem, seu tipo e pelo sítio onde estão localizados. Por exemplo, MCs murinos expressam TLR1, 2, 4 e 6, já MCs derivados do cordão umbilical de humanos expressam TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 (Kumar e Sharma, 2010). Presente nestas duas espécies, o receptor TLR2 está envolvido nos processos de reconhecimento de grupamentos fúngicos, e de sinalização que culminam na transcrição dos genes responsivos a NF- κ B, importantes nas respostas imunes e nos processos de hipersensibilidade imediata (Mekori e Metcalf, 2000; Tete *et al.*, 2012).

Assim como os TLRs, as lectinas tipo C (CLRs) também são PRRs, sendo também fundamentais para o reconhecimento de fungos e indução de respostas imunes inatas e adaptativas. As CLRs constituem uma família de moléculas ligadoras de carboidrato cálcio-dependentes, possuindo vários tipos de receptores com diferentes especificidades e funções. Dentre os receptores desta família estão a dectina-1, a dectina-2, DC-SIGN e o receptor de manose ligado à lectina (Saijo e Iwakura, 2011). Dectina-1 constitui o principal receptor de reconhecimento de β -glucanos, presentes na parede celular dos fungos. Após a ligação entre a dectina-1 e β -glucanos, ocorre indução da produção de quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias e do *burst* respiratório, por meio de diferentes vias que atuam sinergicamente. Através de um mecanismo de regulação cruzada, esta ligação induz e modula a ativação canônica ou não-canônica de NF- κ B, podendo haver cooperação durante o reconhecimento com outros PRRs, como o TLR2 (Netea *et al.*, 2008; Romani, 2011; Saijo e Iwakura, 2011).

Em suma, ambos os receptores, TLR2 e dectina-1, ativam a via de sinalização da família NF- κ B, também conhecida como REL e composta pela combinação homo ou heterodimérica de cinco membros, entre eles o NF- κ B1 ou p50 e o RELa ou p65 (Perkins, 2007; Brown *et al.*, 2008; Pereira e Oakley, 2008). Os complexos formados desta combinação

ficam retidos no citoplasma celular por uma família de proteínas inibitórias chamadas de IκBs. Para que ocorra a ativação e liberação do NF-κB, as proteínas IκBs necessitam ser fosforiladas por complexos de IκBs quinases (IKK). Após este evento, o NF-κB se transloca para o núcleo celular onde regula mais de 200 genes da função celular e da inflamação. Entretanto, a expressão desses genes é fortemente coordenada pela ação de outras vias de sinalização, e o resultado da transcrição de NF-κB depende do tipo de célula ativada, da natureza da indução, dos receptores envolvidos, e da presença ou não de sinergismo entre eles (Perkins, 2007; Brown *et al.*, 2008).

O reconhecimento de microrganismos patogênicos, por TLRs ou dectina-1, ativa fatores de transcrição NF-κB, resultando em diversos mecanismos imunes como a liberação de citocinas, de quimiocinas e substâncias microbidas, a expressão de moléculas de adesão e a ativação de fagocitose ou de enzimas que geram reativos intermediários, como a iNOS (NO sintase induzível) (Beinke e Ley, 2004; Saijo e Iwakura, 2011). Dependendo do tipo de ativação celular, a sinalização via NF-κB pode ocorrer de forma clássica (ou canônica) ou de maneira alternativa (não-canônica). Na via clássica, induzida por diversos estímulos inflamatórios e caracterizada por uma rápida fosforilação de IκBα, há uma ativação e liberação do complexo p50:p65 que se transloca para o núcleo. Já na via alternativa, tipicamente desencadeada pela molécula de superfície CD40 e por receptores de linfotóxina β, ocorre a ativação e liberação do dímero RelB:p52 que se transloca para o núcleo a fim de modular a expressão gênica (Beinke e Ley, 2004; Perkins, 2007; Pereira e Oakley, 2008).

1.5. Resposta Antimicrobiana dos Mastócitos

Apesar da palavra “mastócitos” derivar do termo alemão “mastzellen” que significa “bem alimentado” ou “engorda”, a via endocítica destas células e suas implicações não têm sido devidamente analisadas. Através do acoplamento de ligantes específicos dos patógenos aos receptores de sua membrana celular, os mastócitos não só podem ativar vias de secreção de produtos, mas também desencadear mecanismos destinados a endocitose de partículas destes patógenos (Malaviya *et al.*, 1994; Gil e Gozalbo, 2006; Lima *et al.*, 2013). Este mecanismo denominado fagocitose é um processo de englobamento de partículas grandes (>0,5nm) importante no combate a infecções, podendo envolver a morte dos microrganismos fagocitados, por mecanismos oxidativos ou não, e a apresentação de antígenos aos linfócitos T (Gilchrist *et al.*, 2003), sendo ativado por diversos estímulos como sinais via TLRs e CLRs (Drummond e Brown, 2011; Romani, 2011).

Ainda hoje, as discussões sobre a ocorrência de fagocitose pelos MCs frente aos diferentes microrganismos existentes são escassas. Alguns relatos de fagocitose de diferentes cepas bacterianas já foram reportados como *Escherichia coli* (*E. coli*) fimbriadas ou não, *Salmonella typhi* (*S. typhi*) na presença de fatores do complemento, *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) opsonizados ou não. Porém, sua atividade contra fungos como *C. albicans* ainda não fora discutida na literatura (Malaviya *et al.*, 1994; Malaviya *et al.*, 1996; Abraham e Malaviya, 1997; Lima *et al.*, 2013).

Durante a fagocitose de microrganismos, as células, como os neutrófilos, aumentam seu consumo de oxigênio molecular, resultando em um *burst* respiratório com produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e espécies reativas do nitrogênio (*reactive nitrogen species* – RNS). A formação dessas moléculas é um potente mecanismo, capaz de danificar lipídeos, proteínas e DNA (Gilchrist *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2009). Os MCs são células capazes de se ativar e de produzir ROS após estimulação imunológica ou não (Swindle *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003; Marshall e Jawdat, 2004; Yoshimaru *et al.*, 2006). Além disso, receptores como dectina-1 e TLR2 estão envolvidos na produção destes agentes oxidativos de maneira independente ou cooperativa (Roeder *et al.*, 2004; Drummond e Brown, 2011).

Já a produção e liberação de óxido nítrico (*nitric oxide* – NO) por essas células ainda é controversa. Muitos autores afirmam a existência deste mecanismo microbicida nos mastócitos, porém outros negam a ocorrência da produção de NO por estas células frente a alguns estímulos (Gilchrist *et al.*, 2004; Swindle *et al.*, 2004; Swindle e Metcalfe, 2007). Entretanto, após desafio com *C. albicans*, ambas as dosagens, ROS e RNS, em MCs, ainda não foram demonstradas nos principais bancos de dados.

1.6. C. albicans, TLR2, Dectina-1 e Resposta Antimicrobiana

C. albicans é um fungo comumente encontrado no trato gastrointestinal, incluindo cavidade bucal, e no trato genitourinário feminino dos seres humanos, podendo ocasionar uma micose oportunista denominada candidose. Este fungo vive de várias formas celulares fenotipicamente distintas, incluindo leveduras ou blastóporos, pseudo-hifas e hifas (Tuite *et al.*, 2004; Gow e Hube, 2012). A parede celular fúngica varia na sua composição de acordo com seu morfotipo, estágio de crescimento e seu habitat, e constitui, no fungo, a principal fonte de PAMPs que são reconhecidos pelo PRRs das células mamalianas. Os três

maiores componentes fúngicos são: β -glucanos, a quitina e as mananas (Hiller *et al.*, 2011; Romani, 2011; Saijo e Iwakura, 2011). No caso de *C. albicans*, seu reconhecimento pela imunidade inata é mediado por PRRs, como os TLRs e CLRs, por possuir na superfície de sua parede celular as substâncias fosfolipomanana (PLM) e β -glucanos (Tuite *et al.*, 2004; Gil e Gozalbo, 2006; Weindl *et al.*, 2011). A PLM é um glicolípido que desencadeia diferentes respostas como a ativação do NF- κ B e produção de TNF- α , por meio principalmente da ligação com o TLR2 (Bellocchio *et al.*, 2004; Gil e Gozalbo, 2006).

C. albicans também apresenta na composição de sua parede celular o açúcar β -glucano, capaz de estimular o receptor dectina-1, com papel fundamental no reconhecimento de leveduras de *C. albicans*; porém, aparentemente, não reconhece hifas devido aos β -glucanos serem expressos nos brotamentos das leveduras e estarem mascarados nas hifas, favorecendo o escape do reconhecimento pelo receptor (Netea *et al.*, 2008; Romani, 2011; Weindl *et al.*, 2011).

A fagocitose de *Candida* spp., pode ser estimulada via sinais da dectina-1 e TLRs, constituindo um dos principais mecanismos protetores contra esta infecção. Na presença ou não de opsonização, este processo ocorre e é realizado por macrófagos e neutrófilos que reconhecem e englobam leveduras. Na ausência de opsoninas, PAMPs associados ao fungo, como a fosfolipomanana e o β -glucano, são reconhecidos pelos TLRs e a dectina-1, ativando funções efetoras antifúngicas nos fagócitos e em outros tipos celulares, embora existam estudos que afirmem que os receptores TLR não participam da internalização de *C. albicans* (Roeder *et al.*, 2004; Shoham e Levitz, 2005; Netea *et al.*, 2008; Drummond e Brown, 2011; Maneu *et al.*, 2011).

Recentemente, estudos demonstraram que camundongos depletados de dectina-1 ou TLR-2 são mais susceptíveis a infecções por *C. albicans*, em função de prejuízo nos principais fenômenos de defesa antifúngica, como produção de citocinas, recrutamento de fagócitos, fagocitose e morte microbiana, o que sugere os importantes papéis da dectina-1 e TLR2 para uma defesa anti-*Candida* in vivo. Entretanto, existem estudos que não detectaram este aumento de susceptibilidade, ou até mesmo prejuízo ao hospedeiro (Bellocchio *et al.*, 2004; Netea, Suttmüller, *et al.*, 2004; Netea, Van Der Meer, *et al.*, 2004; Villamon *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2005; Gasparoto *et al.*, 2010).

Após bloqueio da dectina-1 in vitro por anticorpos específicos, também foi demonstrado um prejuízo na resposta contra *C. albicans*, devido a uma inibição das vias fagocíticas e microbidas, com diminuição na produção de IL-12, IL-6, TNF- α , ânion superóxido e de NO (Netea *et al.*, 2008; Skrzypek *et al.*, 2009). Com relação à participação de

TLR2, sua expressão foi aumentada em neutrófilos após desafio com leveduras de *C. albicans* (Bellocchio et al., 2004). Já em macrófagos, verificou-se também um aumento da expressão de outros receptores envolvidos na fagocitose, como a própria dectina-1 (Filler, 2006; Drummond e Brown, 2011).

In vivo observou-se diminuição dos níveis de NO no fluido peritoneal de animais TLR2^{-/-} infectados ou não por *C. albicans*, em comparação aos animais selvagens. Estes resultados corroboram aqueles in vitro, avaliando neutrófilos peritoneais (Tessarolli et al., 2010). Outros estudos sugerem o envolvimento do TLR2 no controle da liberação de ROS e RNS por neutrófilos (Bellocchio et al., 2004; Brown et al., 2008). Porém, a ocorrência da fagocitose, pelos MCs, após desafio in vitro com *C. albicans*, ainda não foi caracterizada, considerando a literatura vigente. Ainda, a produção de ROS e de RNS, além dos receptores envolvidos com estes mecanismos de defesa contra este fungo, em MCs, não foram ainda relatados.

Sendo assim, no presente trabalho, pretendemos avaliar as respostas fagocitária e candidacida dos MCs contra leveduras de *C. albicans*. O envolvimento, de forma isolada ou colaborativa, dos receptores TLR2 e dectina-1 no reconhecimento fúngico e nestas respostas protetoras.

2 Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar mecanismos de defesa desenvolvidos por mastócitos frente ao desafio com *C. albicans*.

Especificamente:

- I. avaliar a capacidade fagocítica de mastócitos frente ao desafio com *C. albicans*,
- II. avaliar a produção e a liberação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por mastócitos desafiados com *C. albicans*, e
- III. avaliar a participação dos receptores TLR2 e dectina-1, de forma isolada ou cooperativa, nestes mecanismos.

3 Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manejo dos Animais e Obtenção das Células Medulares.

Camundongos C57BL/6 selvagens, machos e fêmeas com 4 a 6 semanas de vida, foram tratados e alojados no biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). Nesta etapa, as normas e técnicas de manipulação dos animais, considerando os aspectos éticos, foram esclarecidas e praticadas. Depois da higienização do local de experimentação e dos instrumentos necessários, os camundongos foram submetidos a uma dose excessiva de anestésico composta de 100 µL do relaxante muscular injetável Anasedan de uso veterinário (Vetbrands®) adicionado a 100 µL do anestésico geral injetável a base de Ketamina Dopalen de uso veterinário (Vetbrands®) (Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais – nº 009/2012). Estes procedimentos também foram executados em camundongos C57BL/6 TLR2^{-/-}, machos e fêmeas com 4 a 6 semanas, reproduzidos no Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP. Em seguida, com os camundongos posicionados ventralmente, foram realizadas incisões próximas à articulação da epífise femoral com o acetábulo para dissecção da região de interesse. Após o isolamento dos membros inferiores em relação ao restante do corpo, realizou-se uma incisão na articulação fêmoro-tibial, para isolar o fêmur. Com o auxílio de bisturi estéril, os fêmures foram desprovidos de quaisquer restos de musculatura e tecido conjuntivo, e colocados em microtubos estéreis contendo RPMI 1640 simples (RPMI com 4.5 g/L de D-glucose, 1.5 g/L de bicarbonato de sódio, 1 mM de piruvato de sódio, 10 mM HEPES e 300 mg/L L-glutamine). Em câmara de fluxo laminar, as epífises femorais foram cortadas e o canal medular exposto e lavado pela injeção de 5 mL de meio RPMI 1640 simples para cada osso. A suspensão celular fora coletada em tubo de 15 mL (**Figura 1**).

Figura 1. Lavagem intramedular. Com auxílio de pinça estéril e seringa, 5 mL de meio RPMI simples foram injetados na cavidade medular do fêmur para obtenção das células medulares utilizadas na diferenciação de mastócitos.

3.2. Diferenciação Celular In Vitro.

A suspensão celular obtida através da lavagem da cavidade medular e composta de meio RPMI simples mais os elementos presentes na medula óssea foi dissociada através de movimentos ascendentes e descendentes com micropipeta de 1000 μ L e ponteira estéril. Esta solução foi submetida a duas centrifugações por 7 minutos a 1500 rpm (9 de aceleração e 9 de *brake*) por duas vezes, sendo o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em 6 mL de meio RPMI 1640 simples. Após a segunda centrifugação, o botão celular foi ressuspenso em 1 mL de RPMI 1640 suplementado por 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor mais 0,5% de penicilina e estreptomicina, 50 μ M de β -mercaptoetanol e $3,024 \times 10^{-3}$ g de bicarbonato de sódio/mL (RPMI 1640 completo). Uma alíquota de 10 μ L foi retirada e diluída em 990 μ L de meio RPMI simples para contagens em câmara de Neubauer. A concentração celular foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ células medulares (com exclusão morfológica de hemácias) e plaqueada em garrafa de 75 cm^2 num volume final de 9 mL com RPMI 1640 completo contendo a citocina Fator de células tronco (SCF) na concentração de 100 ng/mL e

Interleucina 3 (IL-3) na concentração de 20 ng/mL. As garrafas de cultura celular foram incubadas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂ por 21 dias. A cada 3 e 4 dias, as garrafas foram suplementadas com 1,5 mL de meio RPMI 1640 completo para BMMCs contendo 100ng/mL de SCF e 20ng/mL de IL-3.

No 21º dia de cultura, os mastócitos diferenciados a partir de células medulares (*bone marrow mast cells* – BMMCs) foram recuperados das garrafas e depositados em frascos de centrifugação de 50 mL. As suspensões celulares foram centrifugadas a 1500rpm por 7 minutos (9 de aceleração e 6 de *brake*) por duas vezes, sendo o botão celular ressuspensão em 6 mL. Após a segunda centrifugação, o botão celular foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI 1640 completo (suplementado por 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor mais 0,5% de penicilina e estreptomicina) e 10 µL desta solução foram adicionados a 90 µL de Azul de Toluidina. As células positivas para o corante e apresentando morfologia de BMMCs foram contadas e a concentração ajustada conforme o ensaio a ser realizado.

Além da contagem com Azul de Toluidina, foi realizado o controle da viabilidade com o Azul de Trypan e por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), substância que é reduzida a cristais de formazan através de um processo mitocondrial de células viáveis. Para isto, as suspensões celulares foram lavadas com PBS após os desafios. Em seguida, foram adicionados e homogeneizados 200 µL de meio sem soro fetal bovino e 10 µL da solução de MTT. Após 4 horas de incubação em estufa de CO₂ e a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e os cristais formados solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biotek Synergy Mx®) em absorbância a 500 nm. Para avaliar a confiabilidade do teste, foram adicionados poços contendo somente fungos para descartar qualquer interferência por metabolização fúngica. Além disso, o ensaio contou com controles de branco (somente DMSO) e de morte, onde mastócitos foram submetidos a sucessivas pipetagens com água.

Para obter a porcentagem de mastócitos diferenciados a partir de células da medula óssea de camundongos, utilizou-se a imunomarcagem das moléculas de superfície de mastócitos, a qual foi avaliada por meio de citometria de fluxo. Após fixação das células em paraformaldeído 2%, o botão celular foi ressuspensão em PBS adicionado de 0,1 M de glicina por 10 minutos, bem como com PBS/BSA 2% por mais 45 minutos sob leve agitação. Em seguida, as células foram separadas na quantidade de 5 x 10⁵ células em 4 microtubos dispostos da seguinte forma:

- 1) Tubo controle (somente células).

2) Tubo controle contendo os anticorpos marcados com os três fluorocromos utilizados: cianina 5 (Cy5); ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

3) Tubo para marcação dupla contendo os anticorpos anti-CD117 ou *c-kit* conjugado ao Cy5 e anti-subunidade alfa do receptor FC conjugado ao PE.

4) Tubo para marcação com o anticorpo AA4 conjugado a FITC.

As células foram incubadas com os anticorpos por 1 hora a temperatura ambiente, sob leve agitação e depois, lavadas por cinco vezes com PBS por centrifugação. Na sequência, os tubos foram analisados em citômetro de fluxo, utilizando-se o programa “CellQuest”, nas dependências do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemonúcleo Regional de Jaú, sob responsabilidade da Dra Maura Rosane Valério Ikoma.

3.3. *Manipulação de C. albicans SC5314: Crescimento, Lavagem e Contagem.*

Neste estudo foi utilizada a cepa clínica SC5314 de *C. albicans* (REF Ca SC5314). Foram coletados 20 µL da suspensão de fungos congelada a -80°C em glicerol e adicionados a 20 mL de caldo TSB com 0,5% de cloranfenicol em Erlenmeyer estéril. O inóculo foi deixado na estufa a 37°C por 48 horas e, após este período, foi homogeneizado e transferido para tubo de 50 mL para centrifugação a 5000 rpm, 10 minutos, 25°C, com 9 de aceleração e 9 de *brake*. O sobrenadante foi desprezado (com ponteira de 1000 µL) e foram adicionados 5 mL de PBS estéril. Depois de homogeneizar no vórtex, o tubo foi novamente centrifugado a 5000 rpm, 10 minutos, 25°C, com 9 de aceleração e 9 de *brake* e o sobrenadante desprezado (com ponteira de 1000µL). Em seguida, foram adicionados 6 mL de PBS estéril (filtrado). Este procedimento foi realizado por duas vezes. Uma suspensão de 10 µL de fungos foi adicionada a 90 µL de PBS e a contagem das leveduras em câmara de Neubauer realizada. Em seguida, a morte de *C. albicans* foi induzida por autoclavagem a 121°C durante 30 minutos.

3.4. *Bloqueio in vitro do receptor Dectina-1*

BMMCs diferenciados a partir de células medulares de camundongos selvagens (BMMCs Wt) ou de camundongos TLR2^{-/-} (BMMCs TLR2^{-/-}) foram incubados com o anticorpos de rato anti-dectina-1 de camundongos (AbD Serotec, cat. MCA2289EL) por 60 minutos a 37°C na concentração de 2 µg/mL em PBS-BSA. Após esta incubação, a suspensão

foi centrifugada duas vezes a 1500 rpm, por 5 minutos a temperatura ambiente, e as células submetidas aos ensaios descritos nas próximas seções.

Para confirmação da eficácia dos anticorpos e verificação da expressão do receptor dectina-1, realizou-se a imunofluorescência do receptor sobre BMMCs. Para tal, foram utilizados 2 µg/mL em PBS-BSA de anticorpos de rato anti-dectina-1 de camundongos (AbD Serotec, cat. MCA2289EL), sobre células recém diferenciadas desafiadas ou não com *C. albicans* na proporção de 1 célula para 50 fungos. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm, por 7 minutos a temperatura ambiente e o botão celular obtido foi fixado com paraformaldeído 2% por 2 minutos. Após este período, fora realizada uma incubação durante 15 minutos a 37°C com solução altamente proteica (Leite Molico®) a 1% e, posteriormente, outra incubação com anticorpos de cabra anti-IgG de rato ligado à molécula TRITC (*Jackson immunoresearch*; n° do catálogo: 112-025-167) por uma hora a 37°C, na concentração de 4 µg/mL. Após mais duas lavagens, as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e depositadas sobre lamínulas previamente tratadas com adesivo (Biobond®) por 5 minutos para permitir a aderência dos BMMCs. Em seguida, as lamínulas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD®) e, posteriormente, analisadas em microscopia de fluorescência convencional (Axiostar Plus HBO 50/AC – Zeiss) e microscopia de varredura confocal a laser (Leica TCS SPE n° Série 11888352).

3.5. Classificação dos Grupos Experimentais

Para as avaliações da presente pesquisa, os BMMCs obtidos foram assim classificados:

- BMMCs Wt: BMMCs obtidos de camundongos selvagens.
- BMMCs TLR2^{-/-}: BMMCs obtidos de camundongos TLR2^{-/-}.
- BMMCs BD-1: BMMCs obtidos de camundongos selvagens e submetidos ao ensaio de bloqueio do receptor dectina-1.
- BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1: BMMCs obtidos de camundongos TLR2^{-/-} e submetidos ao ensaio de bloqueio do receptor dectina-1.

3.6. Desafio com *C. albicans* SC5314 e Ensaio de Fagocitose.

Inicialmente, leveduras mortas de *C. albicans* SC5314 e zimosan derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich®) foram incubados com a molécula FITC (1:1000 em PBS) em uma proporção de uma parte de FITC para duas partes do estímulo por uma hora a 37°C, sob leve agitação (75 rpm). Após este período, as suspensões foram lavadas duas vezes com PBS estéril a 5000 rpm por 10 minutos a 24°C. Em seguida, 10⁵ BMMCs Wt ou derivados de camundongos C57BL/6 TLR2^{-/-} depletados (BMMCs TLR2^{-/-}) ou oriundos destes dois tipos de camundongos e com seus receptores dectina-1 bloqueados (BMMCs BD-1 e BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1, respectivamente) foram desafiados com zimosan (200 µg/mL) ou com leveduras mortas de *C. albicans* SC5314 (1 mastócito: 50 levedura) marcadas com FITC a 37°C com leve agitação (75 rpm) durante 30, 60 e 120 minutos em duplicatas. Após o desafio, as suspensões celulares foram lavadas a 1500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspensas em 500 µL de Azul de Trypan 1% por 30 minutos para a supressão da fluorescência verde extracelular, a qual representa os fungos/componentes fúngicos não internalizados. Em seguida, as suspensões celulares foram lavadas 2x a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para remoção do excesso de corante. Após este período, os mastócitos foram fixados com paraformaldeído por 20 minutos à temperatura ambiente e lavados com PBS conforme o passo anterior. Por fim, os botões celulares foram ressuspensos em 200 µL de PBS e depositados sobre lamínulas circulares de 13 mm previamente tratadas com adesivo (Biobond®) e deixados por 5 minutos para se permitir a aderência das células às lamínulas. As lamínulas foram depositadas sobre lâminas de vidro para microscopia contendo meio de montagem associado a DAPI (VECTASHIELD®). A análise qualitativa da ocorrência de fagocitose (fluorescência verde no interior da célula) foi realizada em microscópio de varredura confocal a laser. Além desta análise, realizou-se a contagem das células apresentando ou não o estímulo fagocitado por meio de microscopia de fluorescência convencional. No caso de *C. albicans*, também foi quantificado o número de leveduras internalizadas.

3.7. Desafio com *C. albicans* SC5314 e Produção Intra e Extracelular de Óxido Nítrico.

BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 (10⁵ células) foram desafiados em microtubos com *C. albicans* SC5314 (1:50 células) ou com 100 ng/mL de LPS ou 200 µg/mL de zimosan durante 30, 60 e 120 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Como controle negativo, as células foram incubadas com RPMI 1640 completo. Após estes períodos, os microtubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 24°C e o sobrenadante armazenado a -80°C para futuras dosagens de NO extracelular pelo método de Griess. As células presentes no botão celular foram ressuspensas em PBS e centrifugadas novamente como no passo anterior. Para a dosagem intracelular de NO foi utilizado o DAF-FM diacetato a 10 µM (Molecular probes®; n° do catálogo: D-23842) adicionando-se 4 µL deste reagente em 196 µL de PBS contendo as células desafiadas ou não por 30 minutos no escuro e a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados duas vezes e o botão celular ressuspenso em 100 µL de PBS, os quais foram transferidos para a placa de 96 poços preta. Em seguida, foi realizada a leitura de fluorescência através do fundo da placa em espectrofotômetro na excitação de 495 nm e emissão de 515 nm com sensibilidade do leitor ajustada em 100 e leitura em toda área do poço. Os dados foram expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU).

Para avaliação da liberação de NO extracelular, os sobrenadantes armazenados foram descongelados e submetidos ao método de Griess. Para isso, pipetou-se 100 µL das amostras, da curva padrão de nitrato de sódio (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 µM) e de água deionizada (branco) em placas de 96 poços. Em seguida, 100 µL do reagente de Griess preparado a partir de mistura igual de NEED 1% [N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride] (Sigma Aldrich®) e sulfanilamida 1% (Sigma Aldrich®) foram adicionados sobre as amostras, a curva padrão e o branco, e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e sob proteção da luz. Após este período, a leitura foi realizada em absorbância (540nm) no espectrofotômetro.

3.8. Desafio com *C. albicans* SC5314 e Produção Intra e Extracelular de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 (5×10^4 células) foram desafiados em microtubos com *C. albicans* SC5314 (1:50) ou com 100 ng/mL de LPS ou 200 µg/mL de zimosan durante 30, 60 e 120 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Como controle negativo, as células foram incubadas com RPMI 1640 completo. Para a dosagem intracelular de H₂O₂ utilizou-se o kit CellROX® Deep Red Reagent (Molecular probes®; n° do catálogo: C10422). Após o período de desafio, os microtubos foram centrifugados duas vezes a 1500 rpm por 5 minutos a 24°C, ressuspensos em 199 µL de PBS e a solução transferida para placa de 96 poços preta, adicionando-se 1 µL do reagente fluorescente a 5 µM, por 30 minutos a 37°C no escuro e sob leve agitação (75 rpm). Em seguida, realizou-se a leitura de fluorescência através do fundo da placa em espectrofotômetro na excitação de 640 nm e emissão de 665 nm com sensibilidade do leitor ajustada em 100 e leitura em toda área do poço. Os dados foram expressos em RFU.

Para dosar H₂O₂ extracelular, utilizou-se o kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular probes®; n° do catálogo: A22188). Para este reagente, o desafio citado anteriormente foi realizado em tampão fornecido pelo fabricante. Ao final dos tempos de estímulo, os microtubos foram centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos a 24°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para avaliações futuras. No dia da realização da dosagem, foram preparados todos os reagentes necessários e fornecidos pelo fabricante, entre eles a curva padrão de H₂O₂ e a solução de trabalho contendo 50 µL de 10mM de amplex, 100 µL de *Horseradish peroxidase* (HRP) e 4,85 mL de solução tampão 1x. Foram preparadas diluições de 1 a 10 µM de H₂O₂, das quais foram pipetados 50 µL para cada ponto da curva em placa de 96 poços preta. Em um dos poços da placa, pipetaram-se somente tampão 1x (branco) e, no restante deles, todas as amostras armazenadas anteriormente, no volume de 50 µL. Em seguida, 50 µL da solução de trabalho foram adicionados e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, realizou-se a leitura de fluorescência com excitação de 530 nm e emissão em 590 nm ou de absorbância em 560 nm.

3.9. Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) dos valores ou porcentagens obtidos para cada grupo e estímulo. A análise estatística foi realizada por meio do teste estatístico Anova fatorial seguido do teste de Fischer, para as análises de fagocitose, leveduras e produções intra e extracelulares de NO e de H₂O₂, ou seguido de Tukey para a análise da viabilidade por MTT. Valores de $p < 0.05$ foram considerados como indicativos de significância estatística. Para avaliar as correlações entre variáveis, empregou-se o teste de correlação de Pearson analisando-se segundo Taylor (1990).

4 Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização Fenotípica/Morfológica e Viabilidade dos Mastócitos Obtidos de Camundongos Selvagens

Após 21 dias de cultura primária, em média 98 % da população celular constituiu mastócitos (**Figuras 2A e 2B**). Suas características morfológicas, como alta granulosidade em microscopia óptica invertida (**Figura 2C**) e coloração de grânulos metacromáticos em microscopia óptica convencional (**Figura 2D**), confirmaram aspectos inerentes a este tipo celular e permitiram diferenciá-los de outros subtipos celulares presentes.

Em geral, observaram-se características interessantes durante a diferenciação dos BMMCs. Ao redor do 6º dia de cultura, havia aglomerados de células nos sobrenadantes (**Figura 2E**), enquanto que outras células, aderidas à superfície interna do recipiente de cultura, apresentaram um aspecto fusiforme semelhante a macrófagos (**Figura 2F**). Nos dias consecutivos, ocorreria uma grande proliferação das células em suspensão, as quais se tornaram maiores e granulosas (**Figura 2G**), enquanto que a outra população celular observada não demonstrou grandes alterações com o cultivo. No 21º dia de cultura, com o recolhimento das células em suspensão, a metacromasia dos grânulos fora em geral intensamente observada e as células aderidas descartadas.

Após coloração com Azul de Trypan, os BMMCs revelaram valores médios de viabilidade de cerca de 98 % após 21 dias de cultura. Após os desafios com LPS, zimosan ou *C. albicans*, este percentual foi de cerca de 90 %. A avaliação pelo método de MTT confirmou as quedas na viabilidade celular após os estímulos com zimosan, aos 60 minutos, e com *C. albicans*, após 30 e 60 minutos de desafio (**Figura 3**). Todas as situações experimentais apresentaram valores de viabilidade estatisticamente maiores com relação ao controle de morte celular com água deionizada ($p = 0,0001$).

A imunomarcagem do receptor dectina-1 sobre BMMCs foi homogênea, apresentando fluorescência de baixa intensidade em células não estimuladas, o que confirma que este receptor é expresso constitutivamente (**Figura 4A**). Após desafio com *C. albicans*, notou-se um aumento de expressão do referido receptor (**Figura 4B**).

Figura 2. Caracterização da população celular in vitro. Cerca de 98% das células coletadas foram imunopositivas para as moléculas CD117 (*c-kit*) e AA4 (A e B). Em cultura, BMMCs apresentaram características peculiares como formação de aglomerados celulares (asterisco) (C) e alta granulosidade (seta vermelha) (D). Em D, observa-se uma população celular fusiforme aderida à superfície interna da garrafa de cultura (seta preta). Ao final dos 21 dias, a metacromasia dos grânulos foi observada (E), bem como o fenômeno de

desgranulação após estresse (F) (A e B: Citometria de fluxo; C e D: microscopia invertida em campo claro; E e F: microscopia óptica convencional em campo claro, após coloração com Azul de Toluidina).

Figura 3. Viabilidade dos BMMCs Wt após desafio in vitro com LPS, zimosan ou *C. albicans*. Após os desafios, os BMMCs apresentaram redução significativa da viabilidade celular aos 30 e 60 minutos, em comparação a células não estimuladas (método do MTT). * $p = 0,017$; ** $p = 0,026$ e *** $p = 0,0017$; DO – densidade óptica.

Figura 4. Receptores dectina-1 (vermelho) na superfície de BMMCs Wt desafiados (B) ou não (A) com *C. albicans*. Os núcleos corados com DAPI estão em azul (Imunofluorescência – Microscopia de varredura confocal a laser).

4.2. FAGOCITOSE PELOS MASTÓCITOS**4.2.1. *Mastócitos obtidos de camundongos selvagens fagocitaram in vitro zimosan e C. albicans***

BMMCs Wt demonstraram capacidade de fagocitar zimosan e *C. albicans* a partir de 30 minutos de desafio (**Figura 5**), apresentando taxas médias de 22,2 e 13,4 %, respectivamente. Após 60 minutos, as taxas de fagocitose subiram significativamente para 83 % sob o estímulo com zimosan e 74,52 % com *C. albicans*. Entretanto, com 120 minutos, esta habilidade foi reduzida, apresentando redução significativa para 19 e 12,85 %, respectivamente (**Figura 6**). Comparando-se os estímulos, a habilidade dos BMMCs Wt para fagocitar zimosan ou *C. albicans* foi semelhante em todos os tempos avaliados (**Apêndices A e B**).

Figura 5. Fagocitose de *C. albicans* por Mastócitos após 30 minutos de desafio. Em (A), observam-se leveduras de *C. albicans* coradas com FITC (verde) e, em (B), núcleo de mastócito marcado com DAPI (azul). Em (C), observa-se a mesma célula em campo claro e, em (D), o *merge* das 3 microfotografias anteriores. (E) representa a imagem ampliada de (D).

Notam-se leveduras alojadas em fagossomos/fagolisossomos, bem como duas leveduras de *C. albicans* não internalizadas (setas brancas) e fracamente fluorescentes (Microscopia de varredura confocal a laser).

Figura 6. Média dos valores percentuais de BMMCs Wt com zimosan ou *C. albicans* internalizados (taxa de fagocitose). Após 60 minutos, os BMMCs demonstraram significantes taxas de fagocitose de zimosan e de *C. albicans*, com relação aos tempos de 30 e 120 minutos. * $p = 0,017$; ** $p = 0,0001$.

4.2.2. A Fagocitose de zimosan e de *C. albicans* é Alterada em Mastócitos com bloqueio e ou ausência de Receptores dectina-1 e TLR2

BMMCs TLR2^{-/-}, TLR2^{-/-}/BD-1 e BD-1 demonstraram reduzida capacidade de fagocitar zimosan ou *C. albicans*, em comparação com BMMCs Wt (**Figura 7**). As taxas máximas de fagocitose foram de 19,2% para BMMCs TLR2^{-/-} desafiados com zimosan (aos 60 minutos) e de 22,3% para BMMCs BD-1 com *C. albicans* (aos 120 minutos) (**Apêndices A e B**).

Em todos os tempos analisados, a fagocitose de zimosan por BMMCs TLR2^{-/-} ou TLR2^{-/-}/BD-1 foi significativamente menor em relação aos BMMCs Wt (**Figura 7**). Entre os BMMCs BD-1, essa redução também foi significativa em comparação aos BMMCs Wt, porém somente aos 60 minutos (**Figura 7B**).

Após desafio com *C. albicans* por 30 minutos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de fagocitose pelos diferentes grupos celulares

(Figura 7A). Por outro lado, aos 60 minutos, BMMCs TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 fagocitaram significativamente menos *C. albicans* (médias de 19,16 %, 8,12 % e 3 %, respectivamente) que BMMCs Wt (média de 74,52 %) (Figura 7B). Aos 120 minutos, a média dos valores percentuais desta fagocitose por BMMCs BD-1 foi significativamente maior que aquelas observadas entre os BMMCs TLR2^{-/-} e TLR2^{-/-}/BD-1 (Figura 7C).

Além de reduzir a capacidade fagocítica dos BMMCs, esta interferência nos receptores também afetou o padrão de fagocitose observado com o tempo (Figura 8). O pico de fagocitose ocorrido aos 60 minutos pelos BMMCs Wt estimulados com zimosan ou com *C. albicans* somente foi observado nos ensaios envolvendo BMMCs TLR2^{-/-} e zimosan. Nas outras situações experimentais, a interferência nos receptores causou mudanças neste padrão. Interessantemente, BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 desafiados com zimosan por 120 minutos ou com *C. albicans* por 30 e 60 minutos não apresentaram os estímulos internalizados (Figura 8 e Apêndices A e B).

Figura 7. Envolvimento dos PRRs na fagocitose de zimosan e de *C. albicans* por BMDCs. Em geral, após 30 (A), 60 (B) e 120 minutos (C), a fagocitose (média dos valores percentuais) de zimosan ou de *C. albicans* foi afetada pela interferência nos receptores TLR2

e/ou dectina-1. Letras iguais representam diferença estatística: ^a $p=0,0091$; ^b $p=0,012$; ^{c, d, e, f, g} $p<0,0001$; ^h $p=0,033$; ^{i, j} $p=0,013$ e ^k $p=0,040$.

4.2.3. Número de Leveduras de *C. albicans* Fagocitadas por BMMCs é Pouco Alterado durante os períodos de desafio

Houve uma moderada correlação com o tempo ($r=0,52$) ao se avaliar o número de leveduras internalizadas por BMMCs Wt. Aos 30 minutos, uma média de 5 leveduras por mastócito foi observada. Aos 60 minutos, este valor subiu para 8 leveduras/BMMCs e, aos 120 minutos, 13 leveduras internalizadas por célula; valor este estatisticamente diferente da média obtida aos 30 minutos de desafio (**Figura 9 e Apêndice C**).

BMMCs TLR2^{-/-} fagocitaram significativamente mais leveduras aos 60 minutos (média = 6) em relação aos 120 minutos, tempo no qual não ocorrera fagocitose (**Figura 9**). BMMCs BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 não apresentaram diferença significativa entre o número de leveduras fagocitadas após 30, 60 e 120 minutos (**Figura 9 e Apêndice C**).

4.2.4. O Bloqueio de Dectina-1 em BMMCs TLR2^{-/-} Interfere Significativamente no Número de Leveduras de *C. albicans* Fagocitadas

O número de leveduras de *C. albicans* internalizadas por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 foi significativamente menor do que aquele apresentado pelos BMMCs Wt, nos períodos de 60 (médias de 0 e 8, respectivamente) e 120 minutos (médias de 2 e 13, respectivamente). De forma semelhante, BMMC TLR2^{-/-} demonstraram um número menor de leveduras em relação aos BMMCs Wt, porém somente após 120 minutos (médias de 0 e 13, respectivamente) (**Figura 9**).

Figura 8. Interferência nos receptores TLR2 e dectina-1 altera o padrão de fagocitose de zimosan ou de *C. albicans* por BMMCs. Somente no desafio de BMMCs TLR2^{-/-} com zimosan observou-se o pico de fagocitose aos 60 minutos. Nas outras situações experimentais, a interferência nos receptores resultou na alteração dos padrões observados com o tempo. * $p=0,032$.

Figura 9. Número de leveduras de *C. albicans* internalizadas difere com o tempo e é influenciado pelos receptores TLR2 e dectina-1. Nos experimentos com BMMCs Wt, observou-se uma moderada correlação do número de leveduras internalizadas com o tempo de desafio ($r = 0,52$), apresentando uma diferença significativa entre os tempos de 30 e 120 minutos. Com a interferência nos receptores TLR2 e dectina-1, houve uma redução significativa no número de leveduras internalizadas em relação aos BMMCs Wt, aos 60 e 120 minutos. Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p = 0,041$; ^b $p = 0,0008$; ^c $p = 0,004$ e ^d $p = 0,03$. * $p = 0,012$; ** $p = 0,041$.

4.3. ÓXIDO NÍTRICO EM MASTÓCITOS DESAFIADOS COM *C. albicans*

4.3.1. *Produção Intracelular de Óxido Nítrico por BMMCs Wt é Estimulada por Zimosan ou por *C. albicans* após 60 Minutos*

Após 60 minutos, os estímulos com zimosan ou com *C. albicans* elevaram a produção intracelular de NO por BMMCs Wt com as respectivas médias de 2264 e 2617,5 RFUs em comparação aos BMMCs Wt não estimulados (média de 666 RFUs). O controle com LPS também elevou significativamente a produção de NO para cerca de 2617.50 RFUs (Figura 10A). Esta elevação não foi observada nos tempos de 30 e 120 minutos (Apêndice D). A Figura 10B demonstra um pico significativo de produção de NO, aos 60 minutos, após os estímulos com LPS, zimosan ou *C. albicans*, em relação aos tempos de 30 e 120 minutos.

A

B

Figura 10. Produção estimulada de óxido nítrico por BMMCs Wt desafiados com LPS, zimosan ou *C. albicans*. BMMCs Wt estimulados produziram níveis significantes de NO intracelular com relação às células não estimuladas aos 60 minutos (A). Em todos os estímulos, o pico de produção intracelular de NO ocorrera aos 60 minutos de desafio (B). Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p < 0,0001$; ^b $p = 0,0004$ e ^c $p < 0,0001$. ^{*} $p < 0,0001$; ^{**} $p = 0,0008$; ^{***} $p = 0,0007$ e ^{****} $p = 0,014$.

4.3.2. Interferência nos Receptores TLR2 e Dectina-1 Altera a Produção Intracelular de Óxido Nítrico por BMMCs Estimulados

Diferentemente do observado em BMMCs Wt, as células alteradas de seus receptores, ou seja, BMMCs TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1, não foram estimuladas significativamente à produção de NO intracelular por nenhum dos estímulos, ou seja LPS, zimosan ou *C. albicans* (Figuras 11A, 12A e 13A, e Apêndice D).

Apenas os BMMCs TLR2^{-/-} apresentaram um pico significativo de produção intracelular de NO, aos 60 minutos, em relação aos tempos de 30 e 120 minutos, como relatado para os BMMCs Wt. Entretanto, este pico ocorreu na ausência de estímulo, ou após desafio com LPS ou com zimosan, com valores médios de 825, 762 e 914 RFUs (respectivamente), aos 30 minutos, para 1711, 2315 e 2409 RFUs (respectivamente) após 60 minutos de desafio (**Figura 11B**). Aos 120 minutos, notou-se queda desta produção, porém sem significância estatística (**Figura 11B**). Entre os BMMCs BD-1 ou os BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1, os níveis intracelulares de NO foram semelhantes, comparando-se os diferentes tempos de desafio (**Figuras 12B e 13B**).

A **Figura 14A** revela a comparação entre os diferentes grupos de BMMCs. Notou-se que, após 30 minutos de desafio, BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1, tanto estimulados com zimosan quanto com *C. albicans*, produziram significativamente mais NO intracelular (médias de 1811 e 1863 RFUs, respectivamente) que BMMCs Wt, ou TLR2^{-/-} ou BD-1 igualmente estimulados (respectivos valores médios para zimosan de 726, 914 e 838 RFUs; e 889, 968 e 975 RFUs para *C. albicans*). Aos 60 minutos, na ausência de estímulos, BMMCs TLR2^{-/-} produziram significativamente mais este reativo que BMMCs Wt (**Figura 14B**). Em contrapartida, na presença de estímulos, BMMCs Wt e TLR2^{-/-} produziram níveis similares de NO intracelular. Ainda aos 60 minutos, tanto BMMCs BD-1 estimulados (LPS, zimosan ou *C. albicans*) quanto BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 estimulados (LPS ou *C. albicans*) produziram menos NO intracelular que BMMCs Wt (**Figura 14B**). Ainda, BMMCs TLR2^{-/-}, estimulados por LPS ou zimosan, produziram significativamente mais NO intracelular que BMMCs BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 14B**). No tempo de 120 minutos, a produção intracelular de NO por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 não estimulados foi maior que aquela detectada pelos BMMCs Wt ou BD-1 (médias de 2187, 1237 e 1293 RFUs, respectivamente) (**Figura 14C**).

Figura 11. Produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs TLR2^{-/-}. Com a ausência do receptor TLR2, BMMCs não foram capazes de elevar seus níveis de NO intracelular após estímulo com LPS, zimosan ou *C. albicans* (A). Entretanto, os níveis detectados aos 60 minutos de desafio foram significativamente aumentados com relação à produção aos 30 minutos, exceto para *C. albicans* (B). * $p = 0,045$; ** $p = 0,0006$ e *** $p = 0,0009$.

A

B

Figura 12. Produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs BD-1. Após bloqueio do receptor dectina-1, BMMCs não elevaram sua produção de NO intracelular após os estímulos (A) e não foram observadas diferenças nesta produção entre os diferentes tempos de desafio (B).

Figura 13. Produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1. Aos 120 minutos, notaram-se níveis significativamente menores na produção de NO intracelular após estímulo com zimosan ou com *C. albicans* em comparação com BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 não estimulados. Letras iguais diferem estatisticamente: ^{a,b} $p = 0,04$.

Figura 14. Comparação da produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 nos tempos de 30, 60 e 120 minutos de desafio. Após 30 minutos, BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1, tanto estimulados com zimosan quanto com *C. albicans*,

produziram significativamente mais NO intracelular que BMMCs Wt. Após 60 minutos, a produção estimulada de NO intracelular foi afetada pela interferência nos receptores TLR2 e/ou dectina-1. ^a $p=0,015$; ^b $p=0,04$; ^c $p=0,03$; ^d $p=0,02$; ^e $p=0,01$; ^f $p=0,001$; ^g $p=0,002$; ^h $p=0,004$; ⁱ $p=0,009$ e ^j $p=0,003$.

4.3.3. *C. albicans* Induz a Liberação de Óxido Nítrico Extracelular em BMMCs Wt

Em todos os tempos avaliados, *C. albicans* induziu aumento significativo da liberação de NO extracelular por BMMCs Wt em relação a células não estimuladas (**Figura 15A**). Aos 30 minutos, esta produção também foi estatisticamente maior que a detectada após estímulo com zimosan (**Figura 15A**). Com 60 minutos de desafio, LPS e zimosan, além de *C. albicans*, elevaram os níveis de NO extracelular em comparação aos BMMCs Wt não estimulados (**Figura 15A** e **Apêndice E**). Comparando-se a liberação de NO extracelular nos diferentes tempos, os níveis induzidos pelo estímulo com zimosan aumentaram com o tempo (**Apêndice E**), com diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 30 e 60 minutos bem como 30 e 120 minutos (**Figura 15B**). BMMCs Wt desafiados com *C. albicans* apresentaram um pico de liberação de NO extracelular aos 120 minutos, o qual foi diferente significativamente em relação aos outros tempos avaliados (**Figura 15B**).

Figura 15. Liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs Wt. *C. albicans* induziu maior liberação extracelular de NO por BMMCs Wt em todos os tempos avaliados, ao se comparar com células não estimuladas (A). Houve um pico significativo desta liberação após 120 minutos, em relação aos outros tempos (B). Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p=0,0035$; ^b $p=0,006$; ^c $p<0,0001$; ^d $p=0,003$; ^{e,f} $p<0,0001$; ^g $p=0,0001$; ^h $p=0,03$; ⁱ $p=0,04$; ^{j,k,l,m,n} $p<0,0001$. * $p<0,0001$.

4.3.4. Estímulos Fúngicos Não Alteram a Liberação Extracelular de Óxido Nítrico por BMMCs *TLR2*^{-/-}

Somente o estímulo com LPS por 60 minutos gerou aumento significativo da liberação de NO extracelular por BMMCs *TLR2*^{-/-} em relação a células não estimuladas. Neste período, a liberação de NO extracelular estimulada pelo LPS também foi maior que àquela gerada por células estimuladas com zimosan ou com *C. albicans* (Figura 16A).

A Figura 16B demonstra que a liberação de NO extracelular variou significativamente aos 60 minutos de desafio em relação aos outros tempos. Células sob

ausência de estímulo ou sob presença de zimosan ou *C. albicans* demonstraram uma redução da liberação aos 60 minutos; de forma contrária, sob desafio com LPS, houve um pico significativo desta liberação em relação aos tempos de 30 e 120 minutos.

4.3.5. *C. albicans* Não Estimula a Liberação Extracelular de Óxido Nítrico por BMMCs Bloqueados dos Seus Receptores Dectina-1

BMMCs BD-1 estimulados liberaram níveis de NO extracelular significativamente diferentes aos detectados em BMMCs BD-1 não estimulados no período de 120 minutos, ou seja, após estímulo com *C. albicans* os níveis foram menores enquanto que zimosan induziu níveis maiores (**Figura 17A**). Aos 30 minutos, esta liberação após zimosan foi significativamente menor que a detectada na ausência de estímulo ou após os desafios com LPS ou com *C. albicans* (**Figura 17A**).

Comparando-se os tempos de desafio, BMMCs BD-1 não estimulados aumentaram significativamente sua liberação de NO extracelular após 120 minutos de desafio em relação aos níveis detectados aos 30 minutos (**Figura 17B**). Também aos 120 minutos, o LPS elevou a liberação de NO extracelular em relação aos tempos de 30 e 60 minutos (**Figura 17B**). Já o desafio com zimosan demonstrou uma forte correlação com o tempo ($r= 0,9246$), diferindo significativamente as liberações detectadas nos três tempos avaliados (**Figura 17B**).

Figura 16. Liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs TLR2^{-/-}. A liberação extracelular de NO por BMMCs TLR2^{-/-} somente foi significativamente estimulada após desafio de 60 minutos com LPS. Letras iguais diferem estatisticamente: ^{a,b,c} $p < 0,0001$. * $p = 0,005$; ⁺ $p < 0,0001$; [#] $p = 0,008$ e ^α $p = 0,007$.

4.3.6. Na Ausência de TLR2 e Bloqueio de Dectina-1, a Liberação de Óxido Nítrico Extracelular por BMMCs Não Aumenta Após Estímulos

Em nenhum dos tempos avaliados a liberação extracelular de NO por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 após estímulo com LPS, zimosan ou com *C. albicans* diferiu dos níveis detectados na ausência de estímulos (**Figura 18A**). Ainda, aos 60 minutos, esta liberação em todas as situações experimentais foi significativamente menor que as detectadas após 30 ou 120 minutos de desafio (**Figura 18B**).

Figura 17. Liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs BD-1. BMMCs BD-1 liberaram níveis significativos de NO somente após estímulo com zimosan durante 120 minutos. Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p=0,046$; ^b $p=0,0005$; ^c $p=0,0004$; ^d $p=0,005$; ^e $p=0,02$; ^f $p=0,0008$; ^g $p<0,0001$. * $p=0,007$; + $p=0,002$; ++ $p=0,015$; # $p=0,0004$ e ## $p<0,0001$.

4.3.7. Alterações nos Receptores TLR2 e Dectina-1 Prejudicam a Liberação Extracelular de Óxido Nítrico por BMMCs

Após 30 minutos, de desafio BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1 não estimulados ou desafiados com LPS demonstraram níveis semelhantes de liberação extracelular de NO (**Figura 19A**). Com relação ao estímulo com zimosan neste período, BMMCs TLR2^{-/-} e TLR2^{-/-}/BD-1 liberaram significativamente mais NO extracelular que BMMCs Wt e BD-1 (**Figura 19A**). Já no desafio com *C. albicans*, após 30 minutos, a

liberação de NO extracelular por BMMCs Wt foi significativamente maior em relação aos BMMCs TLR2^{-/-} (**Figura 19A**).

Com 60 minutos, esta liberação por BMMCs Wt estimulados com *C. albicans* passou a ser significativamente maior também em relação aos outros grupos celulares avaliados (**Figura 19B**). Além disso, observou-se que BMMCs BD-1 liberaram significativamente mais NO extracelular que BMMCs TLR2^{-/-} e TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 19B**). De forma semelhante ao desafio com *C. albicans*, a liberação de NO após estímulo com zimosan revelou que a ausência e/ou o bloqueio de dectina-1 diminui significativamente esta liberação em relação aos BMMCs Wt, e que BMMCs BD-1 produzem níveis significantes em relação aos BMMCs TLR2^{-/-} e TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 19B**). Estas diferenças estatisticamente significantes no ensaio de 60 minutos com zimosan também foram observadas após 120 minutos de desafio (**Figura 19C**). Avaliando-se o estímulo com LPS, observou-se que, na ausência do receptor TLR2^{-/-}, a liberação de NO extracelular é significativamente aumentada (**Figura 19B**). Na ausência de estímulos, este aumento significativo ocorre após bloqueio do receptor dectina-1 (**Figura 19B**).

Após 120 minutos, a liberação de NO extracelular por BMMCs Wt estimulados com *C. albicans* manteve-se estatisticamente maior em relação aos BMMCs TLR2^{-/-}, BD-1 ou TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 19C**). BMMCs Wt não estimulados liberaram níveis significativos menores comparando-se com BMMCs TLR2^{-/-} e TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 19C**) e, após estímulo com LPS, estas células liberaram significativamente menos NO extracelular que BMMCs TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1, os quais também diferiram entre si, devido à liberação significativa após o bloqueio do receptor dectina-1 (**Figura 19C**).

Figura 18. Liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1. Em todos os tempos avaliados, BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 não liberaram níveis significativos de NO extracelular após estímulo com LPS, zimosan ou *C. albicans*. * $p=0,02$; ** $p=0,015$; + $p=0,03$; ++ $p=0,02$; α $p=0,001$ e $\alpha\alpha$ $p=0,003$.

Figura 19. Comparação entre a liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 e TLR2^{-/-}/BD-1. Principalmente após 60 e 120 minutos, BMMCs Wt liberaram níveis significativos de NO extracelular em comparação com BMMCs TLR2^{-/-}, BD-

1 e TLR2^{-/-}/BD-1. ^a*p*= 0,046; ^b*p*= 0,03; ^c*p*= 0,01; ^d*p*= 0,006; ^e*p*= 0,04; ^f*p*= 0,0002; ^g*p*= 0,0006; ^h*p*= 0,004; ⁱ*p*<0,0001; ^j*p*= 0,003; ^k*p*= 0,0009; ^l*p*= 0,0004; ^m*p*= 0,001; ⁿ*p*= 0,02; ^o*p*= 0,045 e ^p*p*= 0,002.

4.4. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM MASTÓCITOS DESAFIADOS COM *C. albicans*

4.4.1. Desafio com *C. albicans* Não Induz Aumento Significativo na Produção Intracelular de H₂O₂ por BMMCs Wt

Após 30 ou 60 minutos, BMMCs Wt estimulados com zimosan produziram níveis de H₂O₂ significativamente maiores que BMMCs não estimulados ou desafiados com LPS ou com *C. albicans* (**Figura 20A e Apêndice F**). Aos 120 minutos, esta produção após zimosan foi significativamente aumentada quando comparada com BMMCs não estimulados (**Figura 20A**). O LPS também elevou significativamente a produção de H₂O₂, porém somente com relação aos BMMCs não estimulados e desafiados com *C. albicans* aos 60 minutos (**Figura 20A**), gerando o único pico relacionado com o tempo observado nos ensaios de produção de H₂O₂ (**Figura 20B**). Para os demais estímulos, a produção obtida após 30, 60 ou 120 minutos de desafio foi estatisticamente semelhante, embora *C. albicans* tenha elevado a produção de H₂O₂ após 30 e 120 minutos (**Figura 20B e Apêndice F**).

4.4.2. Produção de H₂O₂ Intracelular por BMMCs TLR2^{-/-} ou BD-1 é Significativamente Estimulada por zimosan

Em todos os tempos avaliados, BMMCs TLR2^{-/-} e BD-1 elevaram significativamente sua produção intracelular de H₂O₂ após desafio com zimosan (**Figura 21 e 22A e Apêndice F**). *C. albicans* também elevou a produção deste reativo após 30 e 120 minutos de estímulo sobre BMMCs TLR2^{-/-} e em todos os tempos avaliados com BMMCs BD-1, porém sem significância estatística em ambas as situações experimentais (**Figuras 21 e 22A**). Com relação à comparação dos níveis obtidos nos diferentes tempos avaliados, somente BMMCs BD-1 estimulados com zimosan demonstraram aumento significativo aos 60 minutos com relação aos 30 minutos de desafio (**Figura 22B**).

Figura 20. Produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs Wt após desafios de 30, 60 e 120 minutos com LPS, zimosan ou *C. albicans*. Zimosan foi o principal estimulador da produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs Wt. Letras iguais diferem estatisticamente: ^a, ^b $p < 0,0001$; ^c $p = 0,004$; ^d $p = 0,0005$; ^e $p < 0,0001$; ^f $p = 0,0007$; ^g $p = 0,002$; ^h, ⁱ $p < 0,0001$; * $p = 0,002$ e ** $p = 0,0008$.

Figura 21. Produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs TLR2^{-/-} após desafios de 30, 60 e 120 minutos com LPS, zimosan ou *C. albicans*. Semelhantemente ao observado com BMMCs Wt, BMMCs TLR2^{-/-} produziram os maiores níveis intracelulares de H_2O_2 após estímulo com zimosan. Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p=0,004$; ^b $p=0,006$; ^c, ^d $p=0,004$; ^e $p=0,014$ e ^f $p=0,03$.

4.4.3. Produção de H_2O_2 Intracelular por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 é Afetada Significativamente pelo Estímulo com *C. albicans* após 120 minutos

O estímulo com zimosan resultou no aumento significativo da produção de H_2O_2 por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 após todos os tempos avaliados, com níveis estatisticamente maiores que os gerados pelos outros estímulos ou pelas células não estimuladas (**Figura 23A**). Aos 120 minutos, o estímulo com *C. albicans* elevou os níveis de H_2O_2 de forma significativa em relação às células não estimuladas. Este aumento também foi significativo com relação aos níveis produzidos após o desafio com LPS.

Após 30 minutos, a produção de H_2O_2 intracelular também aumentou após o estímulo com *C. albicans* para 103 RFUs, comparando-se com a média de 34 RFUs obtida na ausência de qualquer estímulo por 30 minutos, porém sem significância estatística. Após 60 minutos, a produção nestas condições foi próxima à detectada nos BMMCs não estimulados (Figura 23A). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis detectados comparando-se os diferentes tempos (Figura 23B).

Figura 22. Produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs BD-1 após desafios de 30, 60 e 120 minutos com LPS, zimosan ou *C. albicans*. BMMCs BD-1 foram significativamente estimulados pelo zimosan em todos os tempos avaliados. Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p=0,002$; ^b $p=0,001$; ^c $p=0,04$; ^{d, e, f, g, h} $p<0,0001$ e ^{*} $p=0,014$.

Figura 23. Produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 após desafios de 30, 60 e 120 minutos com LPS, zimosan ou *C. albicans*. Aos 120 minutos, *C. albicans* induziu uma produção intracelular de H_2O_2 significativa em comparação a estas células não estimuladas. Letras iguais diferem estatisticamente: ^a $p=0,0005$; ^b $p=0,0004$; ^c $p=0,047$; ^d $p=0,004$; ^e $p=0,008$; ^f $p=0,03$; ^g $p<0,0001$; ^h $p=0,03$; ⁱ $p=0,01$ e ^k $p=0,005$.

4.4.4. Produção Intracelular de H_2O_2 por BMMCs Estimulados com LPS ou zimosan, mas Não com *C. albicans*, é Influenciada pelos Receptores TLR2 e Dectina-1

A produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs não estimulados foi semelhante na presença ou ausência/bloqueio dos receptores TLR2 ou dectina-1, em todos os tempos experimentais (**Figura 24**). Aos 30 minutos, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada (**Figura 24A**). Já aos 60 minutos de desafio com LPS, BMMCs Wt produziram níveis de H_2O_2 significativamente maiores que BMMCs TLR2^{-/-}, BD-1 ou TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 24B**). Com relação ao desafio com zimosan neste tempo experimental, a produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs Wt foi significativamente maior em comparação com

BMMCs TLR2^{-/-} e semelhante com relação aos BMMCs BD-1 (**Figura 24B**). Ainda, BMMCs BD-1 produziram níveis significativamente mais elevados em relação aos BMMCs TLR2^{-/-} e TLR2^{-/-}/BD-1 (**Figura 24B**). Ainda, aos 120 minutos, a produção intracelular de H₂O₂ por BMMCs BD-1 desafiados com zimosan manteve-se estatisticamente maior que os níveis produzidos BMMCs TLR2^{-/-}, bem como que em comparação com a produção dos BMMCs Wt (**Figura 24C**). Com relação ao estímulo com *C. albicans*, em todos os tempos avaliados a produção por BMMCs foi semelhante, independente da presença ou bloqueio dos receptores (**Figuras 24A, 24B e 24C**).

Figura 24. Comparação entre a produção intracelular de H_2O_2 por BMMCs Wt, $TLR2^{-/-}$, BD-1 e $TLR2^{-/-}/BD-1$. A ausência do receptor TLR2 nos BMMCs prejudicou a produção

intracelular de H_2O_2 aos 60 minutos de desafio. Aos 120 minutos, o bloqueio de dectina-1 resultou em um aumento significativo da produção deste reativo. ^a $p=0,0007$; ^b $p=0,003$; ^c $p=0,03$; ^d $p=0,004$; ^e $p=0,04$; ^f $p=0,008$; ^g $p<0,0001$ e ^h $p=0,02$.

4.4.5. BMMCs Não Demonstraram Liberação de H_2O_2

Em todas as situações experimentais avaliadas neste trabalho, não houve detecção da liberação de H_2O_2 nos sobrenadantes dos BMMCs desafiados ou não por LPS, zimosan ou *C. albicans*.

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Mecanismos Imunes Desenvolvidos por Mastócitos Contra *C. albicans*: Ataque ou Defesa?

Tradicionalmente, neutrófilos e macrófagos são as células imunes mais associadas à defesa contra *C. albicans* (Miramon *et al.*, 2013). Entretanto, a fagocitose deste fungo por mastócitos pode representar um importante fenômeno no início da infecção, tendo em vista que estas células estão intimamente localizadas nas interfaces do organismo que são colonizadas por *C. albicans*. Na presente pesquisa, observamos que zimosan e *C. albicans* ativaram as vias fagocíticas dos mastócitos (BMMCs Wt) com apenas 30 minutos de desafio e induziram percentuais de fagocitose de cerca de 70 a 80 % após 60 minutos, índices que podem ser considerados altos ao compararmos com o percentual de fagocitose observado em trabalhos envolvendo macrófagos e neutrófilos. Por exemplo, dados não publicados obtidos pelo nosso grupo revelaram percentuais de fagocitose de *C. albicans*, por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, de cerca de 80% após 120 minutos de desafio com fungos viáveis ou mortos pelo calor.

Ainda, na ausência de fatores estimuladores ou opsoninas, SZABO *et al.* (1995) publicaram percentuais de fagocitose de *C. albicans* por macrófagos peritoneais de cerca de 12, 55 e 75 % das células analisadas nos tempos de 30, 60 e 150 minutos, respectivamente (Szabo *et al.*, 1995). Em outro estudo, 40% dos macrófagos peritoneais desafiados por 60 minutos com *C. albicans* apresentaram fungos internalizados e, analisando-se neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal, este percentual foi de 55% (Gasparoto *et al.*, 2010). Ainda, utilizando a mesma cepa e proporção empregada por nós, LINDEN *et al.* (2013) verificaram que 35 % dos neutrófilos analisados apresentaram *C. albicans* internalizadas após 60 minutos de desafio (Linden *et al.*, 2013), metade do percentual obtido nos nossos ensaios com mastócitos.

Além de *C. albicans*, o envolvimento dos mastócitos na defesa contra outras infecções também foi demonstrado. Em 1994, Malaviya *et al.* revelaram que os mastócitos foram capazes de fagocitar e matar *E. coli* de maneira semelhante aos macrófagos, através da acidificação do fagolisossomo e da produção de superóxido (Malaviya *et al.*, 1994). Neste âmbito, trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que mastócitos são capazes de fagocitar o periodontopatógeno Aa de forma semelhante ou até mesmo superior aos

macrófagos, bem como fagocitar *E. coli* previamente opsonizada ou não por fatores do complemento (Lima *et al.*, 2013). Mastócitos são capazes ainda de desenvolver armadilhas extracelulares, as quais podem aprisionar e matar microrganismos, independentes da fagocitose (Von Kockritz-Blickwede *et al.*, 2008; Von Kockritz-Blickwede e Nizet, 2009).

Outras habilidades destas células, que não foram avaliadas no presente estudo, podem favorecer a defesa antifúngica como a desgranulação de uma grande gama de mediadores estocados em seus grânulos e a síntese de citocinas e quimiocinas. Exemplificando, Doener *et al.*, 2013, demonstraram que TNF- α e GM-CSF derivados de mastócitos atuam na ativação de neutrófilos, aumentando sua fagocitose e a geração de espécies reativas de oxigênio (Doener *et al.*, 2013). Na defesa contra *P. aeruginosa*, mastócitos humanos fagocitam esta bactéria e liberam mediadores que ativam moléculas de superfície nos neutrófilos, possibilitando sua migração para o sítio da infecção (Lin *et al.*, 2002).

Outro importante processo desenvolvido por mastócitos e relacionado com a fagocitose por essas células é a apresentação antigênica. Mastócitos são conhecidos como um dos elos entre as imunidades inata e adaptativa por possuírem em sua superfície MHC I e II, além de moléculas coestimulatórias para linfócitos. Por exemplo, ativados pela bactéria *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), os mastócitos além de fagocitarem, processam e apresentam antígenos para os linfócitos T (Mielcarek *et al.*, 2001). Interessantemente, estas células são capazes de produzir IL-23, TGF- β e IL-6, direcionando o desenvolvimento de uma resposta Th17, importante no controle de *C. albicans* na forma comensal (Sayed e Brown, 2007; Gow e Hube, 2012). Sendo assim, são diversos os achados que corroboram a nossa ideia de que o grande percentual de mastócitos apresentando *C. albicans* fagocitadas, na presente pesquisa, pode representar um mecanismo de controle direto sobre a invasão fúngica, de atração e ativação de outras células imunes, e desencadeante de uma resposta específica contra *C. albicans*.

Apesar da já demonstrada semelhança entre os mecanismos de fagocitose de mastócitos e macrófagos, a dinâmica deste processo observada por nós difere da relatada após estudos envolvendo este outro tipo celular. Como já citado, SZABO *et al.* (1995) observaram um aumento do percentual de fagocitose com o tempo. Nosso grupo também demonstrou que, na proporção de 1 macrófago para 2 leveduras de *C. albicans* mortas pelo calor, o percentual de fagocitose aumenta de cerca de 60 % em 30 minutos para 78% em 120 minutos (dados não publicados). No presente trabalho, envolvendo mastócitos (BMMCs Wt), houve um pico de fagocitose de *C. albicans* aos 60 minutos de desafio, fenômeno também observado na

fagocitose de zimosan. Interessantemente, observou-se que as médias de leveduras internalizadas correlacionaram-se positivamente com os tempos de estímulo. Considerando que o fungo utilizado foi previamente inviabilizado, o aumento no número de leveduras internalizadas não pode ser decorrente de uma duplicação fúngica no interior dos mastócitos, porém poderia representar uma dificuldade na eliminação desses patógenos após fagocitose. Entretanto, avaliações específicas sobre a morte destes fungos no interior dos BMMCs necessitam ser realizadas. De acordo com estes dados, nós acreditamos que, a partir dos 60 minutos, inicia-se de fato um processo de eliminação dos fungos fagocitados, visto que, embora o percentual de fagocitose aos 120 minutos tenha diminuído significativamente, a viabilidade dos mastócitos foi mantida em todos os períodos de cultura celular. Assim, neste último período, havia um grande percentual de mastócitos livre de leveduras, os quais podem ter sido capazes de eliminar os fungos previamente internalizados. Possivelmente, ao internalizar *C. albicans*, outros mecanismos celulares sejam ativados nos mastócitos a partir dos 60 minutos. Seguindo este raciocínio, a fagocitose pelos mastócitos seria uma etapa de um processo de defesa antifúngica, representando um passo inicial de reconhecimento e acionamento de outros mecanismos imunes.

A produção intracelular de óxido nítrico pelos mastócitos, após estímulo com *C. albicans*, acompanhou a dinâmica da fagocitose, ou seja, seus maiores níveis intracelulares foram detectados aos 60 minutos, período com o maior percentual de mastócitos apresentando leveduras internalizadas. Assim, a produção intracelular de NO está fortemente associada com a presença fúngica intracelular. Em concordância, após 120 minutos, quando a taxa de fagocitose reduziu significativamente, observou-se queda dos níveis intracelulares de óxido nítrico. Embora tenhamos detectado esta concordância, neste período, os resultados revelaram aumento significativo da liberação deste reativo para o meio extracelular, a qual pode ter sido favorecida pela ativação de mecanismos que levam a exocitose de seus conteúdos, independente de apresentarem ou não fungos internalizados. Possivelmente, a maior capacidade de reconhecimento e de internalização de *C. albicans* in vitro pelos mastócitos ocorre no período de 60 minutos e o NO produzido neste período está atuando no interior das células como microbicida, uma vez que a capacidade antimicrobiana do óxido nítrico frente a *C. albicans* está bem estabelecida (Privett *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2011; Miramon *et al.*, 2012; Miramon *et al.*, 2013). Aos 120 minutos, a taxa de células com fungos internalizados é reduzida, podendo significar que um grande percentual de mastócitos foi capaz de eliminar os fungos internalizados, não tendo ocorrido morte celular significativa em função do tempo de desafio fúngico. Novamente, vale ressaltar que a viabilidade dos mastócitos desafiados com

C. albicans foi semelhante entre todos os tempos avaliados. Estes resultados de viabilidade celular também descartam a possibilidade de que os níveis aumentados de NO extracelular, aos 120 minutos, sejam decorrentes de morte celular. Em suma, acreditamos que os mastócitos internalizaram e mataram *C. albicans* provavelmente via produção de NO.

Considerando que grandes concentrações de óxido nítrico inibem a atividade da enzima NADPH-oxidase (responsável pelo *burst* oxidativo) em células endoteliais (Selemidis *et al.*, 2007), não podemos descartar esta interferência do óxido nítrico na produção intracelular de H₂O₂ pelos BMMCs no presente trabalho, tendo em vista que, aos 60 minutos, *C. albicans* induziu altos níveis intracelulares de óxido nítrico nos mastócitos e, em contrapartida, os menores níveis de H₂O₂ intracelular.

A capacidade de mastócitos em produzir ROS já foi demonstrada (Malaviya *et al.*, 1994; Wolfreys e Oliveira, 1997; Suzuki *et al.*, 2003; Yoshimaru *et al.*, 2006) e, embora em nossa pesquisa, os mastócitos não tenham sido capazes de elevar os níveis de H₂O₂ frente a *C. albicans*, os estímulos com LPS e zimosan induziram aumento significativo deste reativo nestas células, comprovando sua capacidade de produzir H₂O₂ frente a estímulos bacterianos ou fúngicos. Entretanto, a liberação deste reativo não foi detectada em nenhuma das nossas condições experimentais, corroborando os resultados obtidos por SWINDLE *et al.* (2002) que demonstraram que o PMA, um importante ativador da produção de ROS em macrófagos, não induziu liberação significativa destes reativos em mastócitos (Swindle *et al.*, 2002).

Interessantemente, LPS e zimosan induziram aos maiores níveis intracelulares de H₂O₂ e de NO por BMMCs Wt, também aos 60 minutos de desafio. Esta observação juntamente com as outras envolvendo este tempo de estímulo sugerem que os mastócitos, conhecidos por agir rapidamente após estímulo através da desgranulação, levam cerca de 60 minutos para ativar outras vias relacionadas a mecanismos microbicidas, diferentes deste mecanismo de liberação de mediadores pré-formados.

Em vista dos dados apresentados, ressaltamos que este é o primeiro estudo que reporta a capacidade de mastócitos em fagocitar *C. albicans* e produzir óxido nítrico intra e extracelularmente frente a este estímulo. Ainda, confirmamos a produção de H₂O₂ por mastócitos estimulados com o zimosan ou LPS e observamos que estas células reagem diferentemente a estímulos que apresentam os mesmos grupamentos fúngicos β -1,3-glucano, presentes tanto no zimosan quanto na parede celular de *C. albicans* (Gow e Hube, 2012; Gow *et al.*, 2012).

A diminuição da produção intracelular de óxido nítrico após 120 minutos de desafio em relação aos 60 minutos, não pode ser decorrente de uma subversão do sistema

imune exercida pelo fungo, já que utilizamos fungos inviáveis. Porém, sabe-se que mastócitos contêm glutathione (GSH), um tiol que reage com reativos intermediários do nitrogênio, exercendo atividade antioxidante e desintoxicante contra o excesso de óxido nítrico. Em conjunto, os dados supracitados podem corroborar a ideia de que a redução do óxido nítrico intracelular em mastócitos pode também ter sido resultante de mecanismos intracelulares e ou autócrinos que visam proteger a célula e os tecidos vizinhos dos efeitos deletérios do óxido nítrico em excesso. Ainda neste âmbito, devemos considerar também que o tempo de meia-vida deste reativo é inversamente proporcional à sua concentração, ou seja, quanto maior sua concentração mais rapidamente ele será consumido e, conforme o consumo acontece, a concentração cai e o tempo de meia-vida aumenta. Esta característica inerente à molécula de óxido nítrico permite que altas concentrações deste reativo não sejam mantidas por muito tempo no interior das células (Coleman, 2001).

5.2. TLR2 e dectina-1 no processo de fagocitose de *C. albicans* pelos mastócitos

O envolvimento de TLR2 e dectina-1 no reconhecimento de grupamentos fúngicos como a fosfolipomanana e o β 1,3-glucano já foi demonstrado em outros tipos celulares (Netea *et al.*, 2008). Entretanto, este é o primeiro estudo confirmando a importância destes receptores na fagocitose de *C. albicans* por mastócitos. Ao avaliarmos a participação destes PRRs, observamos que em mastócitos os receptores TLR2 e dectina-1 constituem uma importante via de reconhecimento e internalização de *C. albicans*, já que na ausência/bloqueio desses receptores, em conjunto, no presente estudo, não houve taxa de fagocitose deste fungo, principalmente aos 30 e 60 minutos, indicando uma redução total desta taxa em relação aos BMMCs Wt. Por outro lado, a interferência de cada receptor separadamente resultou em uma redução de aproximadamente 80% na taxa de fagocitose de *C. albicans* pelos mastócitos, aos 60 minutos, em relação aos BMMCs Wt. Isso corrobora evidências sobre a cooperação destes receptores durante o reconhecimento de patógenos (Gantner *et al.*, 2003; Yadav e Schorey, 2006; Netea *et al.*, 2008; Willcocks *et al.*, 2013). Porém, esta ação conjunta tem sido relacionada à produção de mediadores pró-inflamatórios e não à fagocitose e à produção de fatores microbicidas (Netea *et al.*, 2008).

Paradoxalmente, Netea *et al.*, em sua revisão científica publicada em 2008 na *Nature Reviews*, afirmaram que TLRs não estão envolvidos na fagocitose de *C. albicans* e que, de maneira pouco esclarecida, estes receptores estariam associados somente à maturação do fagolisossomo e à apresentação antigênica (Netea, 2008). A dectina-1, por sua vez, foi

considerada o receptor associado à fagocitose de microrganismos que expressam β -glucanos, como *C. albicans* (Brown e Gordon, 2001; Brown *et al.*, 2002; Willcocks *et al.*, 2013).

Na ausência de TLR2, independente do bloqueio da dectina-1, além da diminuição da taxa de fagocitose, verificamos no presente trabalho que o número de leveduras fagocitadas por célula foi menor em relação aos BMMCs Wt, evidenciando que este receptor tem uma importante participação no reconhecimento e internalização pelos mastócitos, bem como na quantidade de leveduras internalizadas.

A interferência nos PRRs também afetou a liberação de NO ao meio extracelular, já que os níveis apresentaram-se reduzidos em relação aos BMMCs Wt, principalmente após 60 minutos. Esses dados indicam que os receptores TLR2 e dectina-1 estão envolvidos na indução e no desenvolvimento das respostas fagocítica e microbicida de mastócitos frente a *C. albicans*.

Em resumo, nossos dados indicam que através de um mecanismo associado aos receptores TLR2 e dectina-1, principalmente por meio de sinergismo, os mastócitos fagocitam *C. albicans* e produzem óxido nítrico intracelular, o qual é liberado após queda da taxa de fagocitose.

6 Conclusões

6. CONCLUSÕES

Em resumo, nossos resultados envolvendo *C. albicans* demonstraram:

I. Entre os BMMCs Wt, houve maior taxa de fagocitose com uma maior produção intracelular de NO aos 60 minutos em comparação aos outros tempos. A liberação extracelular de NO foi maior aos 120 minutos em relação aos outros tempos. O número de leveduras fagocitadas aumentou com o tempo, porém com diferença significativa somente entre os tempos de 30 e 120 minutos.

II. Entre os BMMCs TLR2^{-/-}, houve maior número de leveduras fagocitadas aos 60 minutos em comparação aos 120 minutos. Porém, a liberação extracelular de NO foi menor aos 60 minutos em relação aos outros tempos.

III. Comparando-se com os BMMCs Wt, os BMMCs TLR2^{-/-} apresentaram uma redução na taxa de fagocitose, aos 60 minutos, menor liberação de NO extracelular, em todos os tempos, e menor número de leveduras fagocitadas aos 120 minutos.

IV. Comparando-se com os BMMCs Wt, os BMMCs BD-1 e os BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 apresentaram uma redução na taxa de fagocitose com uma menor produção intracelular de NO, aos 60 minutos, e menor liberação de NO extracelular, aos 60 e 120 minutos.

V. Comparando-se com os BMMCs Wt, os BMMCs TLR2^{-/-}/BD-1 apresentaram uma maior produção de NO intracelular, aos 30 minutos, e menor número de leveduras fagocitadas aos 60 e 120 minutos.

Sendo assim, concluímos que os mastócitos são capazes de fagocitar *C. albicans* com concomitante produção de substâncias potencialmente candidadas. Concluímos também que estes mecanismos envolvem o reconhecimento do fungo via TLR2 e dectina-1, principalmente de forma sinérgica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. N.; MALAVIYA, R. Mast cells in infection and immunity. **Infect Immun**, v. 65, n. 9, p. 3501-8, Sep 1997. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284112> >.
- ABRAHAM, S. N.; ST JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 440-52, Jun 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498670> >.
- BEINKE, S.; LEY, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. **Biochem J**, v. 382, n. Pt 2, p. 393-409, Sep 1 2004. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15214841> >.
- BELLOCCHIO, S. et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3059-69, Mar 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978111> >.
- BOURKE, E. et al. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 956-63, Aug 1 2003. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12689944> >.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-7, Sep 6 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544516> >.
- BROWN, G. D. et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. **J Exp Med**, v. 196, n. 3, p. 407-12, Aug 5 2002. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163569> >.
- BROWN, K. D.; CLAUDIO, E.; SIEBENLIST, U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 4, p. 212, 2008. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771589> >.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, Aug 2001. ISSN 1567-5769 (Print) 1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515807> >.
- DAWICKI, W.; MARSHALL, J. S. New and emerging roles for mast cells in host defence. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 31-8, Feb 2007. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126541> >.
- DE VRIES, V. C.; NOELLE, R. J. Mast cell mediators in tolerance. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 5, p. 643-8, Oct 2010. ISSN 1879-0372 (Electronic) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20884193> >.

- DOENER, F. et al. Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions. **Int Immunol**, v. 25, n. 10, p. 553-61, Oct 2013. ISSN 1460-2377 (Electronic) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728776> >.
- DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 392-9, Aug 2011. ISSN 1879-0364 (Electronic) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803640> >.
- FERRARI, C. K. et al. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 59, n. 6, p. 441-8, Dec 2011. ISSN 1661-4917 (Electronic) 0004-069X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21972015> >.
- FILLER, S. G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 333-9, Aug 2006. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837237> >.
- FREITAS, M.; LIMA, J. L.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Anal Chim Acta**, v. 649, n. 1, p. 8-23, Sep 1 2009. ISSN 1873-4324 (Electronic) 0003-2670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664458> >.
- GANTNER, B. N. et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J Exp Med**, v. 197, n. 9, p. 1107-17, May 5 2003. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719479> >.
- GASPAROTO, T. H. et al. Absence of functional TLR4 impairs response of macrophages after *Candida albicans* infection. **Med Mycol**, v. 48, n. 8, p. 1009-17, Dec 2010. ISSN 1460-2709 (Electronic) 1369-3786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465519> >.
- GIL, M. L.; FRADELIZI, D.; GOZALBO, D. TLR2: for or against *Candida albicans*? **Trends Microbiol**, v. 13, n. 7, p. 298-9; discussion 299-301, Jul 2005. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927471> >.
- GIL, M. L.; GOZALBO, D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2299-304, Jul 2006. ISSN 1286-4579 (Print) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782386> >.
- GILCHRIST, M.; HESSLINGER, C.; BEFUS, A. D. Tetrahydrobiopterin, a critical factor in the production and role of nitric oxide in mast cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 50, p. 50607-14, Dec 12 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514683> >.

- GILCHRIST, M.; MCCAULEY, S. D.; BEFUS, A. D. Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 462-9, Jul 15 2004. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044250> >.
- GOW, N. A.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 15, n. 4, p. 406-12, Aug 2012. ISSN 1879-0364 (Electronic) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609181> >.
- GOW, N. A. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 112-22, Feb 2012. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158429> >.
- HILLER, E. et al. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host--focus on the function of cell wall proteins. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 5, p. 384-9, Jun 2011. ISSN 1618-0607 (Electronic) 1438-4221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571590> >.
- KUMAR, V.; SHARMA, A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. **Mol Immunol**, v. 48, n. 1-3, p. 14-25, Nov-Dec 2010. ISSN 1872-9142 (Electronic) 0161-5890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678798> >.
- LIMA, H. G. et al. Mast cells act as phagocytes against the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Periodontol**, v. 84, n. 2, p. 265-72, Feb 2013. ISSN 1943-3670 (Electronic) 0022-3492 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524328> >.
- LIN, T. J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. **J Immunol**, v. 169, n. 8, p. 4522-30, Oct 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370389> >.
- LINDEN, J. R. et al. The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 7, p. 1127-42, Jul 2013. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23279221> >.
- MALAVIYA, R. et al. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. **J Immunol**, v. 152, n. 4, p. 1907-14, Feb 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8120397> >.
- MALAVIYA, R. et al. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. **J Immunol**, v. 156, n. 4, p. 1490-6, Feb 15 1996. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8568252> >.

- MANEU, V. et al. Dectin-1 mediates in vitro phagocytosis of *Candida albicans* yeast cells by retinal microglia. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 148-50, Oct 2011. ISSN 1574-695X (Electronic)
0928-8244 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668824> >.
- MARSHALL, J. S.; JAWDAT, D. M. Mast cells in innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 114, n. 1, p. 21-7, Jul 2004. ISSN 0091-6749 (Print)
0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241339> >.
- MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cells in innate immunity. **Immunol Rev**, v. 173, p. 131-40, Feb 2000. ISSN 0105-2896 (Print)
0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719674> >.
- METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 946-56, Aug 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684881> >.
- MIELCAREK, N. et al. Interaction of *Bordetella pertussis* with mast cells, modulation of cytokine secretion by pertussis toxin. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 181-8, Mar 2001. ISSN 1462-5814 (Print)
1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260141> >.
- MIRAMON, P. et al. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52850, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285201> >.
- MIRAMON, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida spp.* interactions with phagocytic cells. **Med Microbiol Immunol**, v. 202, n. 3, p. 183-95, Jun 2013. ISSN 1432-1831 (Electronic)
0300-8584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354731> >.
- MOON, T. C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 2, p. 111-28, Mar 2010. ISSN 1935-3456 (Electronic)
1933-0219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20043008> >.
- NETEA, M. G. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 67-78, Jan 2008. ISSN 1740-1534 (Electronic)
1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079743> >.
- NETEA, M. G. et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 6, p. 3712-8, Mar 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004175> >.
- NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 11, p. 484-8, Nov 2004. ISSN 0966-842X (Print)

0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488388> >.

NOSAL, R.; NOVOTNY, J.; SIKL, D. The effect of glycoprotein from *Candida albicans* on isolated rat mast cells. **Toxicon**, v. 12, n. 2, p. 103-8, Mar 1974. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137255> >.

NOVAK, N.; BIEBER, T.; PENG, W. M. The immunoglobulin E-Toll-like receptor network. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 151, n. 1, p. 1-7, 2010. ISSN 1423-0097 (Electronic) 1018-2438 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672091> >.

NOVERR, M. C. et al. Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 4996-5003, Sep 2004. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321991> >.

PAGLIARI, C. et al. Role of mast cells as IL10 producing cells in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 331-5, Nov 2006. ISSN 0301-486X (Print) 0301-486X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123031> >.

PALKER, T. J.; DONG, G.; LEITNER, W. W. Mast cells in innate and adaptive immunity to infection. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 1, p. 13-8, Jan 2010. ISSN 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20043290> >.

PEREIRA, S. G.; OAKLEY, F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 8, p. 1425-30, 2008. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693123> >.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 1, p. 49-62, Jan 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183360> >.

PRIVETT, B. J.; NUTZ, S. T.; SCHOENFISCH, M. H. Efficacy of surface-generated nitric oxide against *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. **Biofouling**, v. 26, n. 8, p. 973-83, Nov 2010. ISSN 1029-2454 (Electronic) 0892-7014 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21082455> >.

RAO, K. N.; BROWN, M. A. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1143, p. 83-104, Nov 2008. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076346> >.

ROEDER, A. et al. Toll-like receptors and innate antifungal responses. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 44-9, Jan 2004. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14700551> >.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394104> >.

- SAIJO, S.; IWAKURA, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. **Int Immunol**, v. 23, n. 8, p. 467-72, Aug 2011. ISSN 1460-2377 (Electronic) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677049> >.
- SAYED, B. A.; BROWN, M. A. Mast cells as modulators of T-cell responses. **Immunol Rev**, v. 217, p. 53-64, Jun 2007. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498051> >.
- SELEMIDIS, S. et al. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 2, p. 349-58, Jul 15 2007. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568572> >.
- SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 569-82, Jun 2005. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916679> >.
- SKRZYPEK, F. et al. Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to *Candida albicans* through Syk activation. **Microbes Infect**, v. 11, n. 6-7, p. 661-70, May-Jun 2009. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19358895> >.
- SUNG, W. S.; LEE, J.; LEE, D. G. Fungicidal effect of piscidin on *Candida albicans*: pore formation in lipid vesicles and activity in fungal membranes. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 10, p. 1906-10, Oct 2008. ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827353> >.
- SUR, R.; CAVENDER, D.; MALAVIYA, R. Different approaches to study mast cell functions. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 5, p. 555-67, May 2007. ISSN 1567-5769 (Print) 1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386403> >.
- SUZUKI, Y. et al. Fc epsilon RI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 6119-27, Dec 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634127> >.
- SWINDLE, E. J.; HUNT, J. A.; COLEMAN, J. W. A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly sensitive real-time chemiluminescent probe pholasin: inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. **J Immunol**, v. 169, n. 10, p. 5866-73, Nov 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421969> >.
- SWINDLE, E. J.; METCALFE, D. D.; COLEMAN, J. W. Rodent and human mast cells produce functionally significant intracellular reactive oxygen species but not nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 48751-9, Nov 19 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361524> >.

SWINDLE, E. J.; METCALFE, D. D. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. **Immunol Rev**, v. 217, p. 186-205, Jun 2007. ISSN 0105-2896 (Print)
0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498060> >.

SZABO, I.; GUAN, L.; ROGERS, T. J. Modulation of macrophage phagocytic activity by cell wall components of *Candida albicans*. **Cell Immunol**, v. 164, n. 2, p. 182-8, Sep 1995. ISSN 0008-8749 (Print)
0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656326> >.

TAYLOR, R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. **JDMS**, v. 1, p. 35-39, Jan-Fev 1990.
Disponível em: <<http://www.uk.sagepub.com/salkind2study/articles/05Article01.pdf>>.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Allergy Asthma Proc**, v. 22, n. 3, p. 115-9, May-Jun 2001. ISSN 1088-5412 (Print)
1088-5412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424870> >.

TESSAROLLI, V. et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 129-40, Feb 2010. ISSN 1460-2709 (Electronic)
1369-3786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19468929> >.

TETE, S. et al. Role of mast cells in innate and adaptive immunity. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 26, n. 2, p. 193-201, Apr-Jun 2012. ISSN 0393-974X (Print)
0393-974X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824746> >.

TUITE, A.; MULLICK, A.; GROS, P. Genetic analysis of innate immunity in resistance to *Candida albicans*. **Genes Immun**, v. 5, n. 7, p. 576-87, Nov 2004. ISSN 1466-4879 (Print)
1466-4879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372070> >.

URB, M. et al. *Aspergillus fumigatus* induces immunoglobulin E-independent mast cell degranulation. **J Infect Dis**, v. 200, n. 3, p. 464-72, Aug 1 2009. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19527167> >.

VILLAMON, E. et al. Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. **Microbes Infect**, v. 6, n. 6, p. 542-8, May 2004. ISSN 1286-4579 (Print)
1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158187> >.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3070-80, Mar 15 2008. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18182576> >.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **J Mol Med (Berl)**, v. 87, n. 8, p. 775-83, Aug 2009. ISSN 1432-1440 (Electronic)
0946-2716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444424> >.

WEINDL, G.; WAGENER, J.; SCHALLER, M. Interaction of the mucosal barrier with accessory immune cells during fungal infection. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 5, p. 431-5, Jun 2011. ISSN 1618-0607 (Electronic) 1438-4221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550846> >.

WILLCOCKS, S. et al. Species-specific PAMP recognition by TLR2 and evidence for species-restricted interaction with Dectin-1. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 3, p. 449-58, Sep 2013. ISSN 1938-3673 (Electronic) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23787127> >.

WOLFREYS, K.; OLIVEIRA, D. B. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 1, p. 297-306, Jan 1997. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9022032> >.

YADAV, M.; SCHOREY, J. S. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3168-75, Nov 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825490> >.

YAMAGUCHI, N. et al. Gastrointestinal *Candida* colonisation promotes sensitisation against food antigens by affecting the mucosal barrier in mice. **Gut**, v. 55, n. 7, p. 954-60, Jul 2006. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423887> >.

YANG, Z.; MARSHALL, J. S. Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. **Immunobiology**, v. 214, n. 4, p. 321-30, 2009. ISSN 1878-3279 (Electronic) 0171-2985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327548> >.

YOSHIMARU, T. et al. Silver activates mast cells through reactive oxygen species production and a thiol-sensitive store-independent Ca²⁺ influx. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 11, p. 1949-59, Jun 1 2006. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716896> >.

Apêndices

Apêndice A. Médias percentuais de ocorrência de fagocitose de zimosan por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, TLR2^{-/-}/BD-1 e BD-1 após 30, 60 ou 120 minutos de desafio.

BMMCs	Tempo (minutos)	Média de fagocitose (%)	n	Desvio Padrão
Wt	30	22.24	5	18.93
Wt	60	83.02	3	6.04
Wt	120	19.06	3	15.13
TLR2 ^{-/-}	30	2.87	4	1.38
TLR2 ^{-/-}	60	19.16	3	18.76
TLR2 ^{-/-}	120	0	3	0
BD-1	30	11.3	3	9.94
BD-1	60	8.12	6	6.97
BD-1	120	14.7	3	8.95
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	1.96	3	3.41
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	3	3	5.2
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	0	3	0

Apêndice B. Médias percentuais de ocorrência de fagocitose de *C. albicans* por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, TLR2^{-/-}/BD-1 e BD-1 após 30, 60 ou 120 minutos de desafio.

BMMCs	Tempo (minutos)	Média de fagocitose (%)	n	Desvio Padrão
Wt	30	13.36	5	10.51
Wt	60	74.52	4	17.23
Wt	120	12.85	3	9.5
TLR2 ^{-/-}	30	1.85	4	1.89
TLR2 ^{-/-}	60	14.11	7	17.76
TLR2 ^{-/-}	120	0	3	0
BD-1	30	7.5	3	8.29
BD-1	60	12.66	5	9.64
BD-1	120	22.3	3	2.16
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	0	3	0
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	0	3	0
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	3.93	3	6.81

Apêndice C. Contagem média de leveduras de *C. albicans* fagocitadas por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, TLR2^{-/-}/BD-1 e BD-1 após 30, 60 ou 120 minutos de desafio.

BMMCs	Tempo (minutos)	Média de leveduras fagocitadas	n	Desvio Padrão
Wt	30	5	7	3
Wt	60	8	7	5
Wt	120	13	3	8
TLR2 ^{-/-}	30	2	4	3
TLR2 ^{-/-}	60	6	7	6
TLR2 ^{-/-}	120	0	3	0
BD-1	30	6	3	6
BD-1	60	6	5	2
BD-1	120	8	3	5
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	0	3	0
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	0	3	0
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	2	3	3

Apêndice D. Produção intracelular média de óxido nítrico por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, TLR2^{-/-}/BD-1 e BD-1 após 30, 60 ou 120 minutos de desafio.

BMMCs	Tempo (minutos)	Estímulo	Média da produção de óxido nítrico (URF*)	n	Desvio Padrão
Wt	30	meio	1009.00	3	508.42
Wt	30	LPS	824.33	3	493.66
Wt	30	Zim	726.33	3	662.05
Wt	30	Ca	889.00	3	914.75
Wt	60	meio	666.00	3	129.97
Wt	60	LPS	2617.50	3	308.31
Wt	60	Zim	2264.00	3	901.22
Wt	60	Ca	2617.50	3	308.31
Wt	120	meio	1236.67	3	550.99
Wt	120	LPS	1118.00	3	393.78
Wt	120	Zim	1418.67	3	628.31
Wt	120	Ca	1518.67	3	481.94
TLR2	30	meio	825.00	3	177.65
TLR2	30	LPS	761.67	3	197.53
TLR2	30	Zim	914.33	3	210.72
TLR2	30	Ca	967.67	3	115.14
TLR2	60	meio	1710.50	3	160.24
TLR2	60	LPS	2315.33	3	324.38
TLR2	60	Zim	2409.33	3	317.43
TLR2	60	Ca	1819.17	3	218.78
TLR2	120	meio	1342.33	3	126.77
TLR2	120	LPS	1254.00	3	172.71
TLR2	120	Zim	1374.33	3	48.00
TLR2	120	Ca	1355.00	3	11.27
BD-1	30	meio	651.67	3	625.73
BD-1	30	LPS	713.00	3	456.67
BD-1	30	Zim	837.67	3	424.03
BD-1	30	Ca	974.67	3	678.69

BD-1	60	meio	1123.00	3	362.24
BD-1	60	LPS	1177.00	3	516.43
BD-1	60	Zim	1108.00	3	476.25
BD-1	60	Ca	1274.33	3	632.40
BD-1	120	meio	1293.33	3	960.13
BD-1	120	LPS	1282.33	3	901.97
BD-1	120	Zim	1335.33	3	692.58
BD-1	120	Ca	1357.33	3	514.21
TLR2/BD1	30	meio	1398.67	3	162.35
TLR2/BD1	30	LPS	1379.67	3	54.43
TLR2/BD1	30	Zim	1810.67	3	260.99
TLR2/BD1	30	Ca	1862.67	3	190.08
TLR2/BD1	60	meio	1441.00	3	426.86
TLR2/BD1	60	LPS	1214.33	3	369.65
TLR2/BD1	60	Zim	2106.00	3	854.74
TLR2/BD1	60	Ca	1695.33	3	430.99
TLR2/BD1	120	meio	2186.67	3	1365.40
TLR2/BD1	120	LPS	1461.33	3	1151.08
TLR2/BD1	120	Zim	1292.33	3	292.26
TLR2/BD1	120	Ca	1286.67	3	147.19

* unidades relativas de fluorescência.

Apêndice E. Médias de liberação extracelular de óxido nítrico por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 ou TLR2^{-/-}/BD-1 após desafio com LPS, zimosan ou *C. albicans* por 30, 60 ou 120 minutos.

BMMCs	Tempo (minutos)	Estímulo	Média da liberação de óxido nítrico (URF)	n	Desvio Padrão
Wt	30	meio	7.975333	3	6.909008
Wt	60	meio	0.889833	6	0.657717
Wt	120	meio	21.087500	4	3.348008
Wt	30	LPS	14.389250	4	3.709119
Wt	60	LPS	11.750000	3	1.025579
Wt	120	LPS	2.022333	3	0.975084
Wt	30	Zim	3.454000	3	2.372149
Wt	60	Zim	28.125333	3	4.371499
Wt	120	Zim	46.365333	3	8.457541
Wt	30	Ca	20.421000	3	7.055018
Wt	60	Ca	20.138500	4	11.690934
Wt	120	Ca	49.341000	3	17.633761
TLR2 ^{-/-}	30	meio	12.295333	3	0.653647
TLR2 ^{-/-}	60	meio	0.271990	3	0.275710
TLR2 ^{-/-}	120	meio	11.794167	3	0.386656
TLR2 ^{-/-}	30	LPS	11.537000	3	0.099462
TLR2 ^{-/-}	60	LPS	32.607607	3	10.199910
TLR2 ^{-/-}	120	LPS	11.477500	3	0.225074
TLR2 ^{-/-}	30	Zim	11.853833	3	0.354628
TLR2 ^{-/-}	60	Zim	0.537629	3	0.250150
TLR2 ^{-/-}	120	Zim	11.812500	3	0.125821
TLR2 ^{-/-}	30	Ca	11.547500	3	0.437863
TLR2 ^{-/-}	60	Ca	0.000000	3	0.000000
TLR2 ^{-/-}	120	Ca	11.794167	3	0.194282
BD-1	30	meio	9.474000	3	9.764537
BD-1	60	meio	15.052000	3	5.082773
BD-1	120	meio	20.895000	3	1.232346
BD-1	30	LPS	15.561333	3	4.425335

BD-1	60	LPS	15.370667	3	6.320877
BD-1	120	LPS	25.648000	3	8.231939
BD-1	30	Zim	1.617250	4	1.419864
BD-1	60	Zim	14.793750	4	4.143658
BD-1	120	Zim	32.791000	3	10.061025
BD-1	30	Ca	15.888000	3	6.017413
BD-1	60	Ca	12.806750	4	0.842207
BD-1	120	Ca	11.210000	3	1.579648
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	meio	12.775667	3	0.577628
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	meio	2.921833	3	0.052991
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	meio	13.190333	3	0.911845
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	LPS	12.204667	3	0.483762
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	LPS	2.849833	3	0.035834
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	LPS	12.861333	3	1.159908
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	Zim	12.555000	3	0.919780
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	Zim	3.179167	3	0.167513
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	Zim	12.309500	3	0.376113
TLR2 ^{-/-} /BD1	30	Ca	17.249000	3	9.466201
TLR2 ^{-/-} /BD1	60	Ca	3.279833	3	0.209039
TLR2 ^{-/-} /BD1	120	Ca	12.545667	3	1.145990

* unidades relativas de fluorescência.

Apêndice F. Produção intracelular média de H₂O₂ por BMMCs Wt, TLR2^{-/-}, BD-1 ou TLR2^{-/-}/BD-1 após desafio com LPS, zimosan ou *C. albicans* por 30, 60 ou 120 minutos.

BMMCs	Tempo (minutos)	Estímulo	Produção média de H ₂ O ₂ (URF*)	n	Desvio Padrão
Wt	30 min	meio	33.666667	3	23.115651
Wt	30 min	LPS	33.00	3	24.58
Wt	30 min	Zim	203.67	3	60.09
Wt	30 min	Ca	98.00	3	4.36
Wt	60 min	meio	37.50	5	21.18
Wt	60 min	LPS	132.92	6	41.93
Wt	60 min	Zim	225.90	5	81.27
Wt	60 min	Ca	47.00	5	14.13
Wt	120 min	meio	23.67	3	11.06
Wt	120 min	LPS	25.67	3	10.07
Wt	120 min	Zim	186.33	3	65.53
Wt	120 min	Ca	73.67	3	21.20
TLR2 ^{-/-}	30 min	meio	48.00	3	3.61
TLR2 ^{-/-}	30 min	LPS	52.67	3	3.21
TLR2 ^{-/-}	30 min	Zim	153.33	3	32.01
TLR2 ^{-/-}	30 min	Ca	97.67	3	7.64
TLR2 ^{-/-}	60 min	meio	25.33	3	5.51
TLR2 ^{-/-}	60 min	LPS	24.17	3	3.51
TLR2 ^{-/-}	60 min	Zim	131.17	3	4.25
TLR2 ^{-/-}	60 min	Ca	41.33	3	4.31
TLR2 ^{-/-}	120 min	meio	44.33	3	32.35
TLR2 ^{-/-}	120 min	LPS	59.33	3	20.03
TLR2 ^{-/-}	120 min	Zim	124.67	3	92.20
TLR2 ^{-/-}	120 min	Ca	92.67	3	25.15
BD-1	30 min	meio	37.67	3	14.57
BD-1	30 min	LPS	30.67	3	16.56
BD-1	30 min	Zim	149.67	3	48.64
BD-1	30 min	Ca	75.33	3	29.30

BD-1	60 min	meio	39.00	3	11.27
BD-1	60 min	LPS	38.00	3	13.75
BD-1	60 min	Zim	239.00	3	86.03
BD-1	60 min	Ca	92.67	3	15.28
BD-1	120 min	meio	42.00	3	18.00
BD-1	120 min	LPS	45.67	3	15.18
BD-1	120 min	Zim	283.67	3	211.93
BD-1	120 min	Ca	111.00	3	19.47
TLR2 ^{-/-} /BD1	30 min	meio	34.00	3	2.00
TLR2 ^{-/-} /BD1	30 min	LPS	31.00	3	3.61
TLR2 ^{-/-} /BD1	30 min	Zim	162.67	3	21.46
TLR2 ^{-/-} /BD1	30 min	Ca	103.00	3	24.27
TLR2 ^{-/-} /BD1	60 min	meio	59.00	3	15.10
TLR2 ^{-/-} /BD1	60 min	LPS	66.33	3	23.50
TLR2 ^{-/-} /BD1	60 min	Zim	164.00	3	18.08
TLR2 ^{-/-} /BD1	60 min	Ca	83.67	3	4.04
TLR2 ^{-/-} /BD1	120 min	meio	43.33	3	30.04
TLR2 ^{-/-} /BD1	120 min	LPS	31.33	3	17.93
TLR2 ^{-/-} /BD1	120 min	Zim	212.67	3	11.37
TLR2 ^{-/-} /BD1	120 min	Ca	134.00	3	7.94

* unidades relativas de fluorescência.

Anexos

Anexos

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 009/2012

Bauru, 23 de maio de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação das atividades fagocitária e candidacida de mastócitos: participação de TOLL-like 2 e Dectina-1, e da sinalização via NF-kB**, de autoria de Karen Henriette Pinke, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **21 de maio de 2012**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Vanessa Soares Lara
Docente do Departamento de Estomatologia

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>