CLAUDIA FERIOTTI

**CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES DE PATÓGENOS
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS E MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO FUNGO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

**São Paulo
2011**

CLAUDIA FERIOTTI

**CARACTERIZAÇÃO DE RECEPTORES DE PATÓGENOS
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS E MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO FUNGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

Versão original.

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Feriotti, Claudia.

Caracterização de receptores de patógenos envolvidos na interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo/ Claudia Feriotti. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Vera Lucia Garcia Calich.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunomodulação local e sistêmica de doenças infecciosas pulmonares.

Versão do título para o inglês: Characterization of macrophages receptors from resistant and susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* involved in the interaction with the fungus.

Descritores: 1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Imunidade inata 3. Macrófagos 4. Receptores de manose 5. Receptores de beta-glucanas 6. Habilidade fagocítica I. Calich, Vera Lucia Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0130/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Claudia Feriotti.

Título da Tese: Caracterização de receptores de patógenos envolvidos na interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo.

Orientador(a): Vera Lucia Garcia Calich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **76** nas fls. **7** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, Coordenadora da Linha de Pesquisa **"Paracoccidioidomicose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença"** do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Adriana Pina, Laura Raquel Rios Ribeiro e Simone Bernardino** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.11.2004**.

São Paulo, 24 de novembro de 2004.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seeiaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.044.07

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 76/04/CEEA, datado de 23.11.04 e por solicitação da Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos **Cláudia Feriotti Tunes** e **Eliseu Frank de Araújo** ao projeto de pesquisa "Paracoccidioidomicose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 07 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA- ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa Dra.Vera Calich, pela confiança no meu potencial e por ter sido essencial para esta conquista.

Aos colegas do laboratório pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar: Adriana Pina, Maira Felonato, Simone Bernardino, Claudia Feriotti, Flávio Loures, Tânia Costa, Bruno Motta e Wagner Alves;

A Profa. Dra. Ana Campa, Profa. Dra. Sônia Jancar Negro e Profa. Dra. Maria Heloisa Blotta pela rica participação no exame de qualificação de mestrado;

Aos professores do Departamento de Imunologia que ministraram aulas, palestras e assim contribuíram para o meu entendimento da imunologia;

À Regina de Luca pela disponibilidade de camundongos para a realização dos experimentos;

Aos funcionários da secretaria Jotelma Ribeiro, Amarildo Utiana (in memorian), Amanda Souza e Eni;

Aos funcionários do Biotério do ICB IV pelo cuidadoso e árduo trabalho com os animais de experimentação;

Aos funcionários da Biblioteca SBIB que contribuíram na elaboração, na revisão textual e no apoio e suporte de informática das diretrizes para elaboração desta dissertação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste mestrado.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim; esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta.”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

FERIOTTI, C. **Caracterização de receptores de patógenos envolvidos na interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo.** 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que constitui a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. A interação entre os “Receptores de Reconhecimento de Patógenos” (PRRs) presentes na superfície das células da imunidade inata e os “Padrões Moleculares Associados aos Patógenos” (PAMPs), presentes na superfície dos microrganismos, desencadeiam sinalização intracelular que facilita o reconhecimento e a fagocitose dos patógenos, resultando em morte do microrganismo. O receptor do tipo Toll, TLR4 reconhece LPS, além de várias outras estruturas de carboidratos presentes nos microrganismos. O receptor de manose (MR), membro da família das lectinas do tipo C (CLRs), reconhece as estruturas de manose, fucose e N-acetilglucosamina, através do seu domínio rico em cisteína (CR). A Dectina-1 é uma CLR amplamente co-expressa com TLRs e reconhece estruturas de β -glucanas da parede celular de vários tipos de fungos. O receptor de complemento CR3 (CD11b/CD18) é um receptor fagocítico para partículas opsonizadas por iC3b, e possui um domínio de lectina que reconhece certos monossacarídeos e uma variedade de β -glucanas, além de resíduos de manose. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar alguns receptores de macrófagos de camundongos resistentes e susceptíveis ao *P. brasiliensis* envolvidos na interação com o fungo. Pretendeu-se estudar comparativamente a função dos MR, TLR4, CR3 e Dectina-1 na interação com o *P. brasiliensis*. Avaliamos os índices de fagocitose, a atividade fungicida, a produção do óxido nítrico (NO), a produção de citocinas e, por fim, a expressão de várias proteínas de membrana que caracterizam a ativação celular ou a sua capacidade de apresentação de antígenos. Caracterizamos o efeito de vários agonistas ou antagonistas dos PRRs na interação fungo-macrófago, através do tratamento dos macrófagos com: a) solução de manana [manose α -(1,2),(1,6),(1,3)- ligada derivada de *Sacharomyces cerevisiae*]; b) laminarina [β -(1,3), (1,6) glucana derivada de *Laminaria digitata*]; c) curdlan [β -(1,3) glucana de alto peso molecular e insolúvel derivada de *Alcaligenes faecalis*]; d) anticorpos monoclonais anti-MR (anti-CD206), anti-TLR4 e anti-CD11b (CR3). Nossos resultados mostraram que a utilização da manana como agonista do MR, levou ao aumento da atividade fungicida, da produção de citocinas e de NO, pelos macrófagos de camundongos A/J e B10.A, e diminuição da fagocitose apenas com macrófagos B10.A. A IL-12 foi a citocina induzida em macrófagos B10.A, enquanto que IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β foram produzidas por macrófagos A/J. A expressão de proteínas de membrana, de uma maneira geral, mostrou-se diminuída após o tratamento dos macrófagos com manana em ambas as linhagens. Em contraste, efeitos inibitórios na

ativação dos macrófagos foram observados após o bloqueio dos MRs com anticorpos monoclonais anti-MR. Observou-se baixa atividade fungicida, diminuição da fagocitose e baixa produção de NO e citocinas por ambas as linhagens. O bloqueio dos receptores TLR4 e CR3 com anticorpos monoclonais anti-TLR4 e anti-CD11b levou à inibição dos macrófagos que apresentaram fagocitose diminuída, baixa produção de citocinas pró-inflamatórias, e aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, TGF- β pelos macrófagos A/J e IL-10 pelos macrófagos B10.A. O tratamento dos macrófagos com os agonistas de dectina-1 (laminarina e curdlan) alterou a atividade fungicida, a produção de citocinas e de NO; no entanto, atuaram de maneira diferente entre as linhagens. A laminarina pareceu ativar macrófagos B10.A e inibir A/J; curdlan por sua vez, pareceu ativar macrófagos A/J e inibir B10.A. Em conclusão, nossos dados demonstram que tanto MRs, CR3, TLR4 e Dectina-1 controlam os processos de interação do *P. brasiliensis* com macrófagos murinos, mas a sua atuação e importância dependem do padrão genético do hospedeiro.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Imunidade inata. Macrófagos. Receptores de manose. Receptores de beta-glucanas. Habilidade fagocítica.

ABSTRACT

FERIOTTI, C. **Characterization of pathogen receptors involved in the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and macrophages from resistant and susceptible mice.** 2011. 117 p. P h. D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent systemic mycosis in Latin America, is a systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The interaction between “Pattern Recognition Receptors” (PRRs) on innate immune cells and “Pathogen Associated Molecular Patterns” (PAMPs) on microorganism surface, leads to intracellular signaling which improves the recognition and phagocytosis of pathogens, resulting in a microbicidal effect. Toll-like receptor 4 (TLR4) recognizes LPS and several carbohydrates structures on microorganisms. The mannose receptor (MR), a member of C-type lectin family of receptors (CLRs), recognizes mannose, fucose and N-acetyl glucosamine structures through its cysteine-rich domain (CR). The dectin-1, a CLR broadly co-expressed with TLRs, recognizes β -glucans structures on the cell wall of several types of fungi. The CR3 (CD11b/CD18) is a complement phagocytic receptor for iC3b-opsonized particles, and it has a lectin domain which recognizes some monosaccharides, a broad variety of β -glucans, besides mannose residues. The aim of this work was to characterize the macrophages receptors from resistant and susceptible mice to *P. brasiliensis* involved in the interaction with the fungus. We aimed to study the function of MR, Dectin-1, TLR4 e de CR3 (CD11b/CD18) receptors in the interaction with *P. brasiliensis*. We evaluated the phagocytic index, fungicidal activity, nitric oxide (NO) production, cytokines production, and also the expression of several membrane proteins involved in macrophage activation and antigen presentation. The effect of several agonists or antagonists of PRRs in the interaction fungus-macrophage was characterized by treatment of macrophages with: a) soluble mannan [mannan α -(1,2),(1,6),(1,3)- linked from *Sacharomyces cerevisiae*]; b) laminarin [β -(1,3), (1,6) glucan from *Laminaria digitata*]; c) curdlan, insoluble, high molecular weight, [β -(1,3) glucan from *Alcaligenes faecalis*]; monoclonal antibodies anti-MR (anti-CD206), anti-TLR4 e anti-CD11b (CR3). Our results showed that the use of mannan as an agonist of MR induces elevated fungicidal activity, cytokines secretion, and NO production by A/J and B10.A macrophages. Diminished phagocytosis was detected only with B10.A macrophages, but diminished expression of activation and co-stimulatory molecules was detected in both mouse strains. Interestingly, IL-12 was the cytokine produced by B10.A macrophages whereas IL-6, TNF- α , IL-10 and TGF- β were produced by A/J macrophages. In contrast, inhibitory effects in macrophage activation were observed after MRs blockade by anti-MR monoclonal antibodies. A diminished fungicidal activity, phagocytosis and low NO and cytokines production were observed in both macrophage strains. The blockade of TLR4 and CR3 receptors by anti-TLR4 and anti-CD11b

antibodies led to macrophages inhibition as shown by diminished phagocytosis, low production of pro-inflammatory cytokines and high production of anti-inflammatory cytokines (TGF- β by A/J macrophages and IL-10 by B10.A macrophages). After TLR4 and CR3 inhibition, altered NO production was also observed. The treatment of macrophages with laminarin and curdlan, recognized by dectin-1 resulted in opposite effects in macrophages from different mouse strains. Laminarin appeared to activate B10.A macrophages and inhibit A/J cells, whereas curdlan appeared to activate A/J macrophages and inhibit B10.A cells. In conclusion, our data demonstrate that MRs, CR3, TLR4 and dectin-1 play a role in the interaction between macrophages and *P. brasiliensis* yeast cell. However, their functions depend on the genetic pattern of hosts.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Innate immunity. Macrophages. Mannose receptors. β -glucans receptors. Phagocytic ability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Avaliação da influência da manana na fagocitose/aderência de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	39
Figura 2.	Análise por citometria de fluxo da influencia da manana na fagocitose/aderências de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	40
Figura 3.	Avaliação da influência da manana solúvel na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	41
Figura 4.	Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A.....	42
Figura 5.	Influência da manana na síntese de IL-12, TNF-α e IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	44
Figura 6.	Influência da manana na síntese de IL-10 e TGF-β por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	45
Figura 7.	Avaliação da influência do anticorpo anti-MR na fagocitose/aderência de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	46
Figura 8.	Avaliação do bloqueio dos receptores de manose (MR) com anticorpos monoclonais anti-MR na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	47
Figura 9.	Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A.....	48
Figura 10.	Efeito do bloqueio os receptores de manose por anticorpos anti-MR na produção de IL-12, TNF-α, IL-6, IL-10 e TGF-β.....	49
Figura 11.	Avaliação da influência dos anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na fagocitose/aderência de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	51
Figura 12.	Avaliação do bloqueio com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	52
Figura 13.	Efeito do bloqueio dos receptores CD11b e TLR4 por anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A.....	53
Figura 14.	Efeito do bloqueio os receptores CD11b e TLR4 por anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na produção de IL-12, IL-6, TNF-α, IL-10 e TGF-β.....	54

Figura 15.	Análise da intensidade média de fluorescência (MFI) e da porcentagem dos marcadores de membrana presentes em macrófagos peritoneais não infectados e não-tratados (controles), de camundongos A/J e B10.A por citometria de fluxo.....	55
Figura 16.	Análise da intensidade média de fluorescência (MFI) dos receptores MR, DC-SIGN, TLR4, TLR2, Dectina-1, CD11b, CD11c e dos marcadores constitutivos e de ativação F4/80, IAK, CD40 e CD86 presentes em macrófagos peritoneais de camundongos A/J tratados ou não tratados com manana (2,5mg/mL) e infectados ou não-infectados com Pb.....	57
Figura 17.	Análise da intensidade média de fluorescência (MFI) dos receptores MR, DC-SIGN, TLR4, TLR2, Dectina-1, CD11b, CD11c e dos marcadores constitutivos e de ativação F4/80, IAK, CD40 e CD86 presentes em macrófagos peritoneais de camundongos B10.A tratados ou não tratados.....	58
Figura 18.	Marcadores de membrana de macrófagos: comparação entre linhagens e efeito da manana. Sobreposição dos histogramas indicando a intensidade média de fluorescência das subpopulações de macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	59
Figura 19.	Expressão de marcadores de membrana de macrófagos. Influência do tratamento com manana. Sobreposição dos histogramas indicando a intensidade média de fluorescência das subpopulações de macrófagos de camundongos A/J.....	60
Figura 20.	Efeito da interação de macrófagos com <i>P. brasiliensis</i> na expressão de marcadores de membrana de macrófagos.....	61
Figura 21.	Avaliação da influência da laminarina na fagocitose/aderência de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	63
Figura 22.	Avaliação da influência da laminarina na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	64
Figura 23.	Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 hs de co-cultivo com <i>P. brasiliensis</i>.....	65
Figura 24.	Influência da laminarina na síntese de IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	67

Figura 25.	Influência da laminarina na síntese de IL-12 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	68
Figura 26.	Influência da laminarina na síntese de TNF- α por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	69
Figura 27.	Influência da laminarina na síntese de IL-10 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	71
Figura 28.	Influência da laminarina na síntese de TGF- β por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	72
Figura 29.	Avaliação da influência de curdlan na fagocitose/aderência de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	73
Figura 30.	Avaliação da influência de curdlan na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A.....	75
Figura 31.	Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 hs de co-cultivo com <i>P. brasiliensis</i>	76
Figura 32.	Influência de curdlan na síntese de IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	78
Figura 33.	Influência de curdlan na síntese de TNF- α por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	79
Figura 34.	Influência de curdlan na síntese de IL-10 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	80
Figura 35.	Influência de curdlan na síntese de TGF- β por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo monoclonal
Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHI	Infusão de cérebro e coração
C3b	Proteína opsonina componente do sistema complemento
CD11b	Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides ou Mac-1
CD11c	Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides, ou CR4
CD40	Molécula coestimuladora presente em MØ, DC, linfócito B, liga-se ao CD40L
CD86	Molécula coestimuladora presente em MØ, DC, linfócito B,
D.O.	Densidade óptica
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	Receptor de células dendríticas
Dectina-1	Receptor de beta-glucanas
E.P.	Erro padrão
ELISA	“Enzyme-linked-immunosorbent assay”
FA	Forma adulta da paracoccidioidomicose
FACS	“Fluorescence-activated cell sorting”
FITC	anticorpo marcado com isotiocinado de fluoresceína
FJ	Forma Juvenil da paracoccidioidomicose
FSC	“forward scatter”, tamanho celular
gp 43	Glicoproteína de 43 kilodalton
i.p.	Intraperitoneal
Ia^k	Marcador para expressão de MHC classe II em monócitos
iC3b	Fragmento protéico integrante do sistema complemento
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
KO	“Knockout” ou deficiente
LPS	Lipossacáride de bactéria GRAM negativa
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MØ	Macrófago
MR	Receptor de manose
MyD88	Proteína adaptadora MyD88
NFκB	Fator nuclear κB
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PAMPs	“Pathogen-associated molecular patterns”
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb 18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, isolado 18
PBS	Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2
PBS/AZIDA	Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2 + AZIDA
PCM	Paracoccidioidomicose
PI	“Propidium Iodide”
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear

PRR	“Pattern recognition receptors”
RPMI	Meio para cultura celular, tampão bicarbonato, pH 6,8
SFB	Soro fetal bovino
TGF-β	“T cell receptor”
Th1	Linfócito T “helper” tipo 1
Th2	Linfócito T “helper” tipo 2
Th3	Linfócito T “helper” tipo 3
Th17	Linfócito T “helper” tipo 17
TLR	“Toll like receptor”
TLR1	“Toll like receptor” 1
TLR2	“Toll like receptor” 2
TLR2 KO	“Toll like receptor 2” nocaute
TLR4	“Toll like receptor” 4
TLR4 KO	“Toll like receptor” 4 nocaute
TLR6	“Toll like receptor” 6
TLR9	“Toll like receptor” 9
TNF-α	“Tumor necrosis factor α”
TGF-β	“Transforming growth factor beta”
Treg	Célula T reguladora
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Justificativa.....	30
1.2 Objetivo.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Animais.....	31
2.2 Fungo	31
2.3 Lavado peritoneal e contagem de células	31
2.4 Tratamento das culturas de macrófagos	32
2.5 Infecção dos macrófagos para determinação da atividade fungicida.....	33
2.6 Infecção e tratamento dos macrófagos para determinação de fagocitose	33
2.7 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo	34
2.8 Determinação de unidades formadoras de colônias (UFC)	35
2.9 Dosagem de NO.....	35
2.10 Caracterização das citocinas: ELISA para quantificação de IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β	35
2.11 Citometria de fluxo para caracterização da expressão de marcadores de membrana induzidos pelos diversos tratamentos dos macrófagos.....	36
2.12 Análise estatística dos resultados.....	37
3 RESULTADOS	38
3.1 Influência do receptor de manose MR na interação com <i>P. brasiliensis</i>	38
3.1.1 Efeito da manana na fagocitose de <i>P. brasiliensis</i>	38
3.1.2 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo	39
3.2 Efeito do tratamento com manana na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao <i>P. brasiliensis</i>	41
3.3 Efeito da manana na produção de NO	42
3.4 Dosagem de citocinas.....	43

3.4.1 Efeito da manana na produção de citocinas	43
3.5 Efeito do tratamento com anticorpo anti-MR na fagocitose do fungo	45
3.6 Efeito do bloqueio do MR com anticorpo anti-MR na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	46
3.7 Efeito do anticorpo anti-MR na produção de NO	47
3.8 Dosagem de citocinas.....	48
3.8.1 Efeito do bloqueio do MR com anticorpo anti-MR na produção de citocinas.....	48
3.9 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 com anticorpos anti- CD11b e anti-TLR4 na fagocitose de <i>P. brasiliensis</i>	50
3.10 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao <i>P. brasiliensis</i>	51
3.11 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 na produção de NO.....	52
3.12 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11B/CD18) e TLR4 na produção de citocinas.....	53
3.13 Análise da expressão dos marcadores de membrana de macrófagos controles - não infectados pelo <i>P. brasiliensis</i> e não tratados com manana	55
3.14 Influência da manana na expressão de marcadores de membrana de macrófagos infectados ou não pelo <i>P. brasiliensis</i>	56
3.15 Influência do receptor dectina-1 na interação dos macrófagos com <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	62
3.15.1 Efeito da laminarina na fagocitose de <i>P. brasiliensis</i>	62
3.15.2 Efeito do tratamento com laminarina na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao <i>P. brasiliensis</i>	63
3.15.3 Efeito da laminarina na produção de NO.....	64
3.16 Efeito da laminarina na produção de citocinas	66
3.16.1 Efeito da laminarina na produção de IL-6	66

3.16.2 Efeito da laminarina na produção de IL-12.	67
3.16.3 Efeito da laminarina na produção de TNF- α	69
3.16.4 Efeito da laminarina na produção de IL-10	70
3.16.5 Efeito da laminarina na produção de TGF- β	72
3.17 Efeito do curdlan na fagocitose de <i>P. brasiliensis</i>	73
3.18 Efeito do tratamento com curdlan na atividade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis ao <i>P. brasiliensis</i>	74
3.19 Efeito do curdlan na produção de NO.....	75
3.20 Efeito do curdlan na produção de citocinas.....	77
3.20.1 Efeito do curdlan na produção de IL-6.....	78
3.20.2 Efeito do curdlan na produção de TNF α	78
3.20.3 Efeito do curdlan na produção de IL-10.....	80
3.20.4 Efeito do curdlan na produção de TGF- β	81
4 DISCUSSÃO.....	82
4.1 Influência do MR na interação de macrófagos com <i>P. brasiliensis</i>	82
4.2 Influência do receptor de β -glucana, dectina-1, na interação de macrófagos com <i>P. brasiliensis</i>	88
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica autóctone da América Latina causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo dimórfico, conhecido apenas em sua forma assexuada, saprobiota do solo. Na natureza, o fungo apresenta a forma filamentosa que produz os conídios, as células infectantes. Uma vez inalados, os propágulos dão origem a formas leveduriformes do fungo que constituirão sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro (RESTREPO, 1985).

De caráter endêmico entre as populações de zona rural, a paracoccidioidomicose (PCM) acomete principalmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos, sendo rara a incidência abaixo de 14 anos de idade (RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001). A via inalatória é considerada a principal porta de entrada da infecção, e a partir de um foco primário pulmonar, ocorreria disseminação linfática ou hematogênica para diferentes regiões do organismo, inclusive para a mucosa da orofaringe (MCEWEN et al., 1987; BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993). O contato inicial do hospedeiro com o fungo costuma evoluir para uma infecção subclínica ou assintomática; se há progressão da infecção, duas formas clínicas são descritas: a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta. A primeira é menos freqüente e é observada em crianças de ambos os sexos ou em adultos abaixo de 30 anos e suas manifestações clínicas são decorrentes do rápido e progressivo envolvimento de órgãos do sistema mononuclear fagocitário (FRANCO, 1987; MONTENEGRO e FRANCO, 1994). A PCM crônica do adulto é a forma de apresentação mais freqüente e caracteriza-se por uma evolução de vários meses onde predominam a adinamia, emagrecimento, lesões tegumentares e às vezes linfadenopatia. O pulmão, órgão mais freqüentemente acometido, dá origem a manifestações clínicas de maneira muito insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispnéia aos esforços (FRANCO, 1987; BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993).

Os pacientes com a forma crônica ou adulta da doença usualmente exibem baixos níveis de anticorpos específicos e apresentam uma adequada imunidade celular, enquanto aqueles com a forma aguda ou juvenil exibem tipicamente altos níveis de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B e uma resposta imune celular deprimida (ARANGO e YARZABAL, 1982; MOTA et al., 1985; CASTAÑEDA et al., 1988; SINGER-VERMES et al., 1993; FAZIOLI, 1997). O padrão da resposta imune associado com a doença progressiva e grave na PCM é caracterizado pelas respostas celulares do tipo

Th1/Th2, sendo que as células Th2 estão preferencialmente associadas com a forma progressiva e grave e as células Th1 associadas com a forma benigna da infecção. Uma resposta imune inadequada de pacientes com a forma grave da PCM pode ser responsável pela anergia das células T (BAIDA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002).

Os linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 produzem as citocinas IL-2 e IFN- γ e os do tipo Th2 produzem IL-4, IL-15, IL-10 e IL-13. O predomínio das células Th1 e a liberação das citocinas pró-inflamatórias ativam a atividade microbicida dos macrófagos, já as células Th2 e a liberação das citocinas anti-inflamatórias desativam os macrófagos e estimulam a produção de anticorpos. Parece ser necessário um balanço dos diferentes grupos de citocinas para que ocorra uma proteção eficiente, formando um complexo circuito imunoregulatório (ROMANI et al., 1997; CALICH e KASHINO, 1998; KARHAWI; COLOMBO; SALOMÃO, 1999).

O uso de modelos murinos de infecção pulmonar e intraperitoneal de PCM tem facilitado a caracterização das células, citocinas e mecanismos reguladores que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune protetora.

Calich et al. (1985) desenvolveram um modelo de infecção intraperitoneal, onde foram demonstradas diferenças significativas nos padrões de susceptibilidade e resistência ao fungo entre varias linhagens isogênicas de camundongos estudadas. A linhagem A/Sn foi caracterizada como a mais resistente enquanto que a linhagem B10.A demonstrou ser altamente susceptível à infecção pelo *P. brasiliensis*. Cano et al. (1995), desenvolveram um modelo de infecção pulmonar com as mesmas linhagens de camundongos utilizando a via intra-traqueal de infecção onde foi demonstrado que camundongos A/Sn desenvolveram PCM crônica, benigna e restrita aos pulmões enquanto que animais B10.A desenvolveram doença disseminada e progressiva. Frente aos resultados obtidos foi possível verificar que os linfócitos T, macrófagos e células B mediadas por interferon-gama (IFN- γ) participavam da resposta à resistência a PCM. Em outro estudo, Cano et al. (1998) demonstraram que o IFN- γ é essencial na resistência a infecções fúngicas; para isso realizaram um estudo *in vivo* utilizando camundongos sensíveis e resistentes ao fungo os quais foram depletados de IFN- γ através do tratamento com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , o que resultou no agravamento da doença em ambas as linhagens, com marcante aumento da carga fúngica pulmonar, disseminação precoce para o fígado e baço e falência da imunidade celular.

Como descrito em outras doenças infecciosas, as quimiocinas produzidas por murinos e humanos na PCM parecem exercer um importante papel na regulação da migração de leucócitos específicos tanto nos processos inflamatórios agudos como nos crônicos. Um

recente estudo realizado por Souto et al. (2003) demonstrou haver uma associação entre altos níveis das quimiocinas MCP-1, IP-10 e Mig com o recrutamento de células mononucleares para os pulmões de camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com *P. brasiliensis*. Contudo, em animais da mesma linhagem nocauteados para o gene do IFN- γ houve a produção de baixos níveis de quimiocinas para células mononucleares e altos níveis de quimiocinas que atraem neutrófilos como KC e MIP-1 α ; demonstrou-se assim, o papel do IFN- γ na regulação da produção de quimiocinas e no recrutamento de leucócitos para os pulmões em modelo murino de PCM.

Os macrófagos, além de produzirem e liberarem mediadores inflamatórios e quimiotáticos, também são eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs). Participam do processo de fagocitose de partículas e agentes microbianos e os carrega via linfáticos aos linfonodos, onde as respostas imunes específicas são geradas. Assim, os macrófagos podem estar envolvidos tanto nas respostas imunes inatas como nas adquiridas ao *P. brasiliensis* atuando como células efetoras da imunidade inata e adquirida. Macrófagos alveolares de camundongos resistentes e susceptíveis ao *P. brasiliensis* foram analisados após a infecção pulmonar e observou-se ausência da produção de peróxido de hidrogênio pelas células obtidas de camundongos susceptíveis, enquanto que os macrófagos de camundongos resistentes produziram níveis elevados destes metabólitos no curso da doença (CANO et al., 1995; KASHINO et al., 1995).

O óxido nítrico (NO) é gerado pela oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina e é um dos principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos (HIBBS; VAVRIN; TAINTOR, 1987; HIBBS et al., 1988). A enzima óxido-nítrico-sintetase induzida (iNOS ou NOS2) é produzida durante a ativação dos macrófagos pelos microrganismos ou produtos bacterianos como LPS, bem como por citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ , TNF- α e IL-12 (CORRALIZA et al., 1995; MACMICKING; XIE; NATHAN; 1997).

Brummer (1994) demonstrou que o mecanismo fungicida de macrófagos na PCM era independente da produção de reagentes intermediários do oxigênio produzidos pela explosão respiratória. Assim, a atividade fungicida não pôde ser abolida pelo tratamento das células com superóxido-dismutase, catalase ou azida sódica. Apesar de vários estudos terem mostrado que a morte do *P. brasiliensis* é dependente de NO produzido por macrófagos ativados por IFN- γ (CANO et al., 1994; GONZALEZ et al., 2000), foi também descrito que a síntese de NO está associada com a imunossupressão de células T (BOCCA et al., 1988; NASCIMENTO et al., 2002). Em altas concentrações o NO pode inibir praticamente todas as

células do sistema imune (células T, B, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) via indução de apoptose, ou inibição da produção de fatores de transcrição, citocinas, proteína-quinases, moléculas do MHC, etc. O NO pode também impedir a migração de células ao tecido inflamado devido à inibição da síntese de moléculas de adesão pelo endotélio (BOGDAN, 2001). Segundo o estudo de Nascimento et al. (2002), a infecção com *P.brasiliensis* em camundongos depletados *in vivo* de NO bem como em camundongos deficientes do gene da NO-sintase induzida (iNOS) levou a doença mais grave e formação de lesões disseminadas e ricas em fungos.

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) atuam na da imunidade inata e parecem proteger camundongos susceptíveis ao *P.brasiliensis*, enquanto que nos camundongos resistentes, a proteção ocorre somente no início da infecção. Em um trabalho recente realizado por Pina et al. (2006), foi observado que a depleção de PMN induzia doença muito grave nos camundongos susceptíveis, associada a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a ativação excessiva do sistema imune pode ser deletéria ao hospedeiro.

No nosso modelo experimental, várias observações indicam que o paradigma Th1/Th2 de ativação da resposta imune adaptativa não explica completamente os fenômenos de resistência e susceptibilidade ao fungo. Assim, a IL-4 é protetora para camundongos susceptíveis (ARRUDA et al., 2004), o tratamento com IL-12 exógena leva à menor disseminação do fungo, mas induz intensa patologia pulmonar associada com exuberante influxo de células inflamatórias (ARRUDA et al., 2002); a depleção de células T CD4⁺ não altera o curso da doença de camundongos susceptíveis (CHIARELLA et al., 2007).

As células da imunidade inata como os macrófagos e células dendríticas utilizam “Receptores de Reconhecimento de Padrão” (PRRs), os quais interagem com estruturas conservadas presentes nos patógenos chamadas de “Padrões Moleculares Associados aos Patógenos” (PAMPs). O reconhecimento pelos PRRs pode ser direto, mediado por PRRs transmembrana ou citoplasmáticos, ou indireto, através do reconhecimento de patógenos opsonizados. A interação entre os PAMPs e os PRRs desencadeia uma sinalização intracelular que facilita a internalização e fagocitose dos patógenos, resultando em morte do microrganismo mediada por espécies reativas do oxigênio (ROS) e enzimas líticas, bem como pela secreção de citocinas e quimiocinas liberadas pelos macrófagos e neutrófilos. O aumento da expressão celular de moléculas de adesão e quimiotáticas irá controlar o afluxo e a ativação de células inflamatórias ao local da infecção (UNDERHILL, 2007; KUMAGAI; TAKEUCHI; AKIRA, 2008; WILLMENT e BROWN, 2008; CALICH et al., 2008).

Os receptores Toll-like (TLRs) são PRRs homólogos aos TLRs de *Drosophila melanogaster* associados com a defesa contra parasitas. Hoje, conhecemos 13 famílias de TLRs em mamíferos que reconhecem diferentes classes de moléculas biológicas presentes em diversos microorganismos, como LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicana, DNA entre outras (KOPP e MEDZHITOV, 1999; THOMA-USZYNSKI et al., 2001; TAKEDA; KAISHO; AKIRA; 2003; SUTMULLER et al., 2006; AKIRA e UEMATSU, 2006). Os TLRs quando ativados desencadeiam uma sinalização intracelular que culmina com a ativação do macrófago e esta ativação pode ocorrer através da ativação do fator de transcrição NF κ B ou do fator de transcrição AP-1; ambos ativam genes a produzir citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-1, a proliferação celular (IL-2) e apoptose. As vias de sinalização de ativação de NF κ B podem ser dependentes da proteína adaptadora MyD88 ou serem mediadas por TRIF, uma proteína adaptadora que tem o domínio TIR (homólogo ao receptor Toll/IL-1), e induz a síntese de IFN- β . A proteína adaptadora TRIF também pode atuar através de outro fator de transcrição, o IRF3, que irá ativar os genes que codificam os IFN- α/β (DOYLE e O'NEILL, 2006). Embora os TLRs não sejam receptores fagocíticos, eles parecem influenciar a fagocitose bem como a maturação do fagossomo, devido à presença de pelo menos alguns deles nos fagossomos (LEE e KIM, 2007). No entanto, Yates e Russell (2005), relataram que a sinalização via TLR não tem efeitos diretos na maturação do fagossomo, como observado em experimentos com macrófagos de camundongos WT e deficientes de TLR2 e TLR4 estimulados com “beads” recobertos com manose, IgG, ou fosfatidilserina; a avaliação da taxa de maturação do fagossomo mostrou não ser alterada em macrófagos deficientes de TLR2 e TLR4.

As lectinas do tipo C (CLRs) compreendem uma família dividida em 17 grupos de receptores que reconhecem diversas estruturas de carboidratos presentes nos microorganismos. A Dectina -1 é uma CLR expressa em macrófagos, células dendríticas, e neutrófilos; é amplamente co-expressa com TLRs e reconhece estruturas de β -glucanas da parede celular de vários tipos de fungos (CAMBI; KOOPMAN; FIDGOR, 2005). A sinalização através de dectina-1 induz a ativação do fator de transcrição NK κ B via Syk quinase e via molécula adaptadora CARD9, induzindo a fagocitose e estimulando a produção de ROS por macrófagos (BROWN e GORDON, 2005; HERRE et al., 2004; GOW et al., 2007; KIMBER e BROWN, 2008; HERNANZ-FALCÓN et al., 2009). Em um trabalho recente, foi demonstrado que a estimulação de DCs com zymosan [um produto da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que é composto de β (1,3)-glucanas e β (1,6)-glucanas, mas também contém α -manana e proteínas contendo manose] levou à produção de IL-10 via dectina-1-

Syk-CARD9; em contraste, houve a produção de IL-12p40 quando a ativação era induzida por TLR2 e usava a molécula adaptadora MyD88 (DENNEHY e BROWN, 2007). Resultados similares foram obtidos em outro trabalho utilizando monócitos humanos e macrófagos murinos estimulados por *C. albicans* (GOW et al., 2007). Por outro lado, as DCs expostas ao zymosan *in vitro* e *in vivo*, demonstraram um fenótipo de DCs regulatórias, caracterizado pela secreção abundante de IL-10, mas pouca IL-6 e ausência de IL-12p70, quando a ligação do zymosan era feita através da dectina-1 e do TLR-2 (DILLON et al., 2006). Trabalhos recentes têm descrito a participação de dectina-1 na indução da resposta imune Th17. Sua ativação por agonistas específicos estimulou a maturação de células dendríticas *in vitro* e a consequente produção de IL-6, TNF- α e IL-23, orientando a polarização de linfócitos CD4 em linfócitos efetores CD4⁺Th17 (LEIBUBDGUT-LANDMANN et al., 2007). Resposta similares também foram observadas em modelos de infecções fúngicas *in vivo* e em humanos (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Curiosamente, a ativação de células dendríticas com agonistas específicos para dectina-1 pode determinar a conversão de células T regulatórias (Treg) em células T produtoras de IL-17 (OSORIO et al., 2008), assim como desencadear a síntese de anticorpos (LEIBUBDGUT-LANDMANN et al., 2007).

Os receptores de Manose (MR) ou CD206 foram as primeiras CLRs identificadas devido ao seu papel no *clearance* de glicoproteínas endógenas e na remoção de hidrolases lisossomais da circulação. É um receptor de reciclagem presente nos compartimentos endocíticos. Os MRs reconhecem uma grande variedade de carboidratos presentes nas superfícies microbianas e fúngicas, incluindo manose, fucose e N-acetilglucosamina, através do seu domínio rico em cisteína (CR) e de uma maneira dependente de Cálcio (Ca²⁺) (SHULERT e ALLEN, 2006). Em humanos, os MRs têm sido detectados nas células localizadas na derme, lamina própria, em áreas de células T das tonsilas, e ainda nas DCs da epiderme de pacientes com dermatite atópica (McKENZIE et al., 2007). Os MRs têm sido implicados na ligação de linfócitos ao endotélio linfático através da interação com L-selectina e esta interação pode ser importante para a saída dos linfócitos dos linfonodos. Há evidência do envolvimento dos MRs na apresentação de antígenos para linfócitos T; a captura de ligantes manosilados por DCs leva à expressão do antígeno associado a moléculas de MHC de classe II e CD1b⁺ (McKENZIE et al., 2007). A expressão de MR é regulada por IL-4, IL-13 e IL-10, e é suprimida por IFN- γ (TAYLOR, et al., 2005).

As DC-SIGN (“dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin”), ou CD209, são CLRs que foram inicialmente caracterizadas como proteínas de ligação ao gp120 do vírus HIV, são também capazes de mediar a interação das DCs com

ICAM-3 independentemente de LFA-1, uma molécula altamente expressa em células T naive (FIDGOR; VAN KOOYK; ADEMA, 2002). As DC-SIGN são altamente expressas por DCs maduras e imaturas do pulmão, pele, tecido mucoso, linfonodos e baço, bem como por subpopulações de macrófagos alveolares e da placenta. As DC-SIGN ligam-se a ICAM-2, e estão implicadas na migração das DCs, mediando a adesão celular e inflamação. As DC-SIGN participam na imunoregulação de processos de imunidade inata e adaptativa; têm influência na ativação primária de células T e estão também envolvidas nos mecanismos de escape de patógenos e tumores (GORDON, 2003; VAN KOOYK e GEIJTENBEEK, 2003; TAYLOR, et al., 2005; ZHOU et al., 2006). A ligação das DC-SIGN aos PAMPs induz a ativação de fosfolipase C γ (PLC γ) e promove o aumento de Ca²⁺ intracelular, sugerindo a sua participação em várias vias de sinalização intracelular como ERK1/2, tirosina quinases Lyn e Syk, dentre outras (ZHOU et al., 2006). Demonstrou-se também que as DC-SIGN atuam como o receptor envolvido no reconhecimento de micobactéria pelas DCs; além disso, as DC-SIGN são co-expressas com MRs na superfície das DCs, uma vez, que foi demonstrado que a adição de anticorpo anti-MR em meio de cultura, inibia a interação entre as DCs e *Mycobacterium bovis* (ZHOU et al., 2006). Assim como os MRs, as DC-SIGN também se ligam a resíduos de manose na superfície de vários microrganismos como *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *Leishmania* sp, e outros (COLMENARES et al., 2004; KOPPEL et al., 2005).

PRRs do tipo NOD-LRR (proteínas com domínios ricos em leucina – LRR, e domínios de oligomerização de nucleotídeos – NOD) são receptores TLR-independentes também denominados NLRs e são caracterizados pela presença de um domínio NOD central, um domínio C-terminal rico em leucinas repetidas (LRR), e um domínio N-terminal responsável pela sinalização, como o domínio de recrutamento de caspase (CARD) e o domínio PYRIN. Os NLRs são PRRs evolucionariamente conservados e detectam microrganismos que penetram no citoplasma celular como as bactérias intracelulares, *p.ex.*: *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes*, ou detectam produtos que podem ser liberados dentro do citoplasma decorrentes dos processos de fagocitose e degradação de micróbios (WILLMENT e BROWN, 2008). Os domínios NOD1 e NOD2 possuem o domínio CARD – N-terminal que reconhece peptidoglicanos bacterianos e muramil dipeptídeos (MDP). Estes receptores transmitem sinais via RIP2/RICK quinase, levando à ativação de NF κ B. Outros membros dos NLRs, os da família NALP, possuem domínio PYRIN ao invés de CARD e estão envolvidos na clivagem de IL-1 β e IL-18 pela caspase-1 em resposta a vários estímulos (UNDERHILL, 2007; KUMAGAI et al., 2008).

Os receptor de complemento CR3 (CD11b/CD18), é uma integrina da superfície de leucócitos e age também como receptor para o fragmento iC3b do sistema complemento. O CR3 funciona como molécula de adesão interagindo com ICAM-1 e ICAM-2, moléculas da super-família de imunoglobulinas no endotélio das vênulas (AGRAMONTE-HEVIA et al., 2002). O CR3 funciona também como receptor fagocítico para partículas opsonizadas por iC3b. Além disso, possui um domínio de lectina que reconhece certos monossacárides e uma variedade de β -glucanas, embora o reconhecimento de maior afinidade ocorra com polímeros com alto conteúdo de manose (BROWN e GORDON, 2003). O componente C1q do complemento parece desempenhar um papel crítico no *clearance* de células apoptóticas, como foi observado em um trabalho de Pickering et al. (2000), através da detecção da ligação de C1q a corpos apoptóticos presentes nos glomérulos renais na glomerulonefrite. Em outro trabalho, Taylor et al. (2005) relataram a influência do componente C1q e dos componentes do soro lábeis pelo calor, os quais aumentaram a ligação das células apoptóticas aos macrófagos.

Trabalhos recentes mostram que há uma colaboração entre os diversos tipos de PRRs, os quais contribuem para o reconhecimento, captura e morte dos microrganismos além de participar na indução e/ou modulação da resposta imune do hospedeiro (WILLMENT e BROWN, 2008; UNDERHILL, 2007; FERWERDA, 2008). A ativação de dectina-1 de DCs por *Candida albicans* ou Curdlan, um polímero linear de β -1,3-glucana derivado de *Alcaligenes faecalis* que se liga especificamente à dectina-1, levou à secreção de IL-23, TGF- β e IL-6 e subsequente ativação de linfócitos T helper 17 (Th17). Esta subpopulação de linfócitos T CD4⁺ secreta a citocina IL-17 que induz a produção de quimiocinas CXC no sítio da infecção, o recrutamento de neutrófilos, e imunoproteção contra patógenos extracelulares (VELDHOEN et al., 2006; MANGAN et al., 2006; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007). Outros trabalhos mostraram que a ativação de dectina-1 por Curdlan, e possivelmente de dectina-2 por *Cândida albicans* na forma de hifas, resulta na sinalização que utiliza a Syk quinase e a proteína adaptadora CARD9 (domínio de recrutamento de caspase), levando à secreção de IL-23 e indução preferencial de células Th17 (GROSS et al. 2006; LEIBUNDGUT-LANDMAN et al., 2007; PALM e MEDZHITOV, 2007). A dectina-1 também trabalha em sinergia com TLR2 e TLR4 na indução de citocinas por monócitos e macrófagos humanos. A estimulação de monócitos e macrófagos humanos por Curdlan levou a um aumento da expressão de TNF- α a qual foi inibida após a adição de GE2, um anticorpo neutralizante de dectina-1. A inibição de TLR2 e TLR4 com anticorpos bloqueadores também resultaram na redução da secreção de TNF- α , que foi ainda mais

proeminente após o bloqueio concomitante da dectina-1, sugerindo a presença de efeitos sinérgicos entre estes receptores (FERWERDA, 2008).

Netea et al. (2006), demonstraram uma cooperação entre sinais envolvendo os receptores TLRs (TLR2 e TLR4) e as CLRs (Dectina-1 e MR) em resposta aos componentes da parede celular de *C. albicans*. Foi observado que os resíduos de manose, fucose e N-acetylglucosamina eram reconhecidos por MR e TLR4 via MyD-88. O reconhecimento de $\beta(1,3)$ -glucanas ocorreu através de dectina-1 e TLR2 via CARD9, tanto em macrófagos murinos como em monócitos humanos. A interação entre estes receptores induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IFN- γ e anti-inflamatória IL-10. Após o bloqueio destes receptores com anticorpos específicos ou através da utilização de macrófagos de camundongos com deleção de genes de TLR4^{-/-}, TLR2^{-/-} e MyD88^{-/-} houve a redução da produção de citocinas; estes estudos mostram um sistema de cooperação entre os receptores TLRs e CLRs na ativação de macrófagos, bem como na modulação da resposta imune.

Em outro trabalho, Netea et al. (2008), investigaram o papel dos receptores TLR1 e TLR6 no reconhecimento dos componentes da parede celular de *Cândida albicans*. Foi observado que os TLR1 e TLR6 formam heterodímeros com TLR2 na superfície dos macrófagos. Verificou-se, entretanto, que o TLR1 não está envolvido na imunoproteção contra *C. albicans*, uma vez que camundongos nocautes de TLR1 (TLR1^{-/-}) mostraram suscetibilidade normal à infecção em um modelo de candidíase disseminada. Por outro lado, os receptores TLR6 modularam o balanço de citocinas Th1/Th2: os camundongos nocautes de TLR6 (TLR6^{-/-}) apresentaram uma diminuição na produção de IL-10 e um aumento da liberação de IFN- γ e com isso apresentaram uma forma mais branda da doença.

A cooperação entre os receptores de complemento (CRs) e os TLRs também tem sido demonstrada (LEE e KIM, 2007). O engajamento do receptor do complemento C5aR com seu agonista C5a, suprime seletivamente a expressão de membros da família de IL-12 induzidos por TLR4 como IL-12p40, IL-23p40 e IL-12p35, mas não de outras citocinas como TNF- α ou IL-10 por macrófagos murinos (HAWLISCH et al., 2005). Outro CR, o gC1qR, que reconhece o fragmento C1q, pode inibir a produção de IL-12 mediada por TLR4, mas não de outras citocinas inflamatórias como IL-6 ou TNF- α em monócitos humanos. Esta supressão é dependente da via PI-3K-Akt, mas não de IL-10, TGF- β ou da via ERK. Isto sugere a existência de um complexo sistema de *cross talk* entre TLRs e CR (BRAUN; LAHEY; KELSALL, 2000; KARP et al., 2000).

São poucos os trabalhos até o momento que estudaram os receptores envolvidos no reconhecimento de *P. brasiliensis* por macrófagos. Em um trabalho recente realizado em nosso

laboratório Loures e Calich (2008), estudaram o envolvimento do receptor TLR2 e da proteína adaptadora de sinalização intracelular MyD88 no reconhecimento do *P. brasiliensis* na paracoccidiodomicose pulmonar, através da utilização de camundongos nocautes de TLR2 da linhagem C57Bl/6 (TLR2^{-/-}). Foi observada a diminuição da recuperação de fungos viáveis no ensaio fungicida utilizando macrófagos peritoneais (*in vitro*), bem como dos homogeneizados de pulmão (*in vivo*). Observou-se também menor fagocitose ou aderência de *P. brasiliensis* à macrófagos TLR2 KO, concomitante à menor produção de NO. Estes dados sugerem que os TLR2 participam ativamente no reconhecimento de leveduras de *P. brasiliensis*. Observou-se também *in vivo* uma diminuição da síntese de IL-10 com concomitante diminuição de IL-12 e MCP-1 e aumento da produção de IL-23 e IL-17 indicando a ativação predominante de uma resposta do tipo Th17. Ao analisar os infiltrados inflamatórios de pulmão, observou-se também a diminuição da frequência de células T regulatórias (Treg). Curiosamente, neste modelo experimental o padrão de resposta Th17 foi indutor de resposta pró-inflamatória marcante, apesar da menor carga fúngica dos camundongos TLR2^{-/-}. Em outro trabalho, Loures et al. (2011), estudando o papel da molécula adaptadora MyD88 e os mecanismos de sinalização desencadeantes na resposta imune inata e adaptativa ao *P. brasiliensis* observaram que camundongos nocautes de MyD88 (MyD88^{-/-}), apresentaram aumento significativo da carga fúngica pulmonar associado a baixos níveis de NO e de citocinas dos tipos Th1, Th2 e Th17, além de diminuída linfoproliferação e impedimento do influxo de células inflamatórias aos pulmões concomitantemente a baixos números de neutrófilos, macrófagos ativados e de células T. A análise histológica dos pulmões de camundongos MyD88^{-/-} revelou granulomas não organizados e coalescentes contendo elevado número de células fúngicas, caracterizando lesão severa. Estes dados sugerem que a ausência da molécula MyD88 causa profundos efeitos na ativação celular, resultando em infecção mais grave. Estes resultados sugerem que o reconhecimento do fungo foi mediado pelos PRR normalmente expressos pelos macrófagos dos camundongos MyD88^{-/-}; no entanto, na ausência de MyD88 houve uma deficiência na sinalização intracelular, impedindo a ativação celular e resultando na diminuição da capacidade fungicida.

Popi et al. (2002), estudaram a influência da gp-43, o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, na interação do fungo com macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e suscetíveis. Verificaram que a gp43 ligava-se ao receptor de manose (MR) e inibia a habilidade fagocítica e fungicida dos macrófagos. Estes achados levaram os autores a postular que a expressão ou secreção da gp43 poderia ser um mecanismo de escape do fungo.

Em conclusão, o uso de receptores diversos para o reconhecimento de certo patógeno pode resultar em processos muito diferentes, às vezes até opostos, de ativação celular. Este processo traduz-se posteriormente em ativação de mecanismos diversos de imunidade inata e adaptativa que conferem proteção ou não contra os patógenos.

1.1 Justificativa

No modelo murino de infecção pulmonar de PCM utilizado em nosso laboratório, temos nos dedicado a entender os mecanismos imunológicos associados aos fenômenos de resistência e susceptibilidade genética ao *P.brasiliensis*. Em trabalho recente de Pina et al. (2008) verificou-se que a interação de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) com o *P. brasiliensis* levava a processos de ativação celular totalmente distintos. Assim, macrófagos de camundongos susceptíveis são facilmente ativáveis por IFN- γ e IL-12, e desenvolvem eficiente atividade fungicida. Após a interação com o *P.brasiliensis*, estas células secretam altos níveis de óxido nítrico (NO), IL-12 e da quimiocina MCP-1. A atividade microbicida era bloqueada pela inibição da síntese de NO, mas não era alterada pela neutralização de IL-10 ou TGF- β por anticorpos monoclonais. Macrófagos de animais resistentes (A/J), entretanto, apresentavam atividades totalmente opostas. Estas células eram fracamente ativáveis por IFN- γ e IL-12, e apresentavam atividade fungicida bastante baixa. Havia a síntese de baixos níveis de NO e a atividade microbicida era restaurada pela inibição do TGF- β , mas não se alterava pelo bloqueio de NO ou de IL-10 (PINA et al., 2008; CALICH e BLOTTA, 2004). Este comportamento oposto dos macrófagos de camundongos susceptíveis e resistentes sugeriu fortemente que o processo de interação entre os mesmos e o *P.brasiliensis* deveria ocorrer através de receptores diferentes que levariam a processos opostos de ativação celular.

1.2 Objetivo

Baseado nos dados antecipadamente apresentados, este trabalho teve como objetivo caracterizar os receptores de macrófagos de camundongos resistentes e susceptíveis ao *P. brasiliensis* envolvidos na interação com o fungo.

Pretendeu-se estudar comparativamente a função do receptor de manose (MR), do receptor de β -glucana (Dectina-1), do receptor do tipo Toll (TLR4) e do receptor de

Complemento CR3 (CD11b/CD18), na fagocitose e atividade microbicida de macrófagos contra o *P. brasiliensis*.

Estes objetivos foram perseguidos através de várias abordagens. Uma delas foi caracterizar o efeito de vários agonistas ou antagonistas dos PRRs na interação fungo-macrófago. Utilizamos então: a) manana [manose α -(1,2),(1,6),(1,3)- ligada derivada de *Sacharomyces cerevisiae*]; b) laminarina [β -(1,3), (1,6) glucana derivada de *Laminaria digitata*]; c) Curdlan [β -(1,3) glucana de alto peso molecular e insolúvel derivada de *Alcaligenes faecalis*]; d) anticorpos monoclonais anti-MR (anti-CD206), anti-TLR4 e anti-CD11b (CR3).

Foram avaliados os índices de fagocitose utilizando dois métodos: 1- com células aderidas a lamínulas; 2- com células isoladas avaliadas por citometria de fluxo. Foi caracterizada a atividade fungicida dos macrófagos na presença e ausência dos bloqueadores específicos para cada um dos receptores acima descritos.

Foram também determinados os padrões de secreção de NO e das citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6, e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) secretadas durante a interação com o fungo. Após ativação dos macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis com agonistas e antagonistas, e/ou fungo, foi também determinada por citometria de fluxo a expressão de várias proteínas de membrana (F4/80, CD86, CD40, IA^k, CD11b, CD11c, DC-SIGN, MR, Dectina-1, TLR2 e TLR4), que caracterizam a ativação celular ou a sua capacidade de apresentação de antígenos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos das linhagens A/J resistentes e B10.A suscetíveis ao *P. brasiliensis* (CALICH et al., 1985) com idade entre 6 a 8 semanas. Esses animais são criados sob condições SPF no Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidos no biotério de animais de experimentação do referido Departamento. Todos os procedimentos com os animais de experimentação foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas / USP (registro nº 76/04) Os camundongos receberam ração NUVILAB (NUVITAL) autoclavada e água ad libitum.

2.2 Fungo

Foi utilizado o isolado Pb 18 (virulento) do *P. brasiliensis*, (KASHINO et al., 1985; SINGER-VERMES et al., 1989). O fungo foi mantido em meio semi-sólido de Fava Netto (1955) a 36 °C, realizando-se repiques semanais. Suspensões celulares foram obtidas na fase exponencial de crescimento leveduriforme, ou seja, após 1 semana de cultivo, e lavadas 3 vezes em solução salina estéril. A concentração de células fúngicas foi ajustada após contagem em câmara hemocitométrica. A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando-se o corante vital Verde-Janus (BERLINER e RECA, 1966), e foi sempre superior a 80%.

2.3 Lavado peritoneal e contagem de células

Camundongos pré-inoculados com tioglicolato foram submetidos a um processo de obtenção de lavado peritoneal (LP). Para isto, os animais foram sacrificados por excesso do anestésico hidrato de cloral seguido de deslocamento cervical, a pele abdominal rebatida, e exposta à musculatura abdominal. O peritônio foi lavado com injeção de 5-6 mL de PBS estéril ou meio de cultura não suplementado (RPMI). O número total de células do LP foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, após a mistura de 90 µL do diluente Turk (Sigma-Aldrich), e 10 µL da suspensão celular. A viabilidade da suspensão celular foi

avaliada utilizando-se o corante Trypan Blue (Sigma-Aldrich), e foi usada sempre quando superior a 80%. As suspensões celulares foram mantidas em gelo para contagem diferencial de células e então centrifugadas a 1200 rpm, a 4 °C por 10 minutos e ressuspensas em 1,0 ml de meio de cultura (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram ajustadas para 1×10^6 /mL e utilizadas nos ensaios de atividade fungicida, produção de citocinas e NO. Um volume de 500 µL de células foi dispensado em cada poço de placas de cultivo de 24 poços. As culturas foram incubadas 37 °C, 5% de CO² e atmosfera umidificada-95% de ar por duas horas. As células não aderentes foram removidas por aspiração e a monocamada aderente foi lavada com o meio de cultura não suplementado (RPMI). O número de células não aderentes foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica, sendo subtraído do número de células peritoneais incubadas.

2.4 Tratamento das culturas de macrófagos

a) Tratamento por IFN- γ : algumas monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos foram incubadas durante a noite a 37 °C, 5% de CO² e atmosfera umidificada tendo sido tratados previamente com 500 µL de meio de cultura suplementado contendo IFN- γ (20.000 pg/ml).

b) Tratamento por agonistas do MR: algumas culturas de macrófagos foram tratadas com solução de manana de baixo PM (Sigma) derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, nas concentrações de 2,5; 0,5 e 0,1 mg/ml, por 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada.

c) Tratamento por agonistas de dectina-1: algumas culturas de macrófagos foram tratadas com soluções de laminarina, β -(1,3) (1,6) glucana derivada de *Laminaria digitata* (Sigma) (0,8; 0,2 e 0,05 mg/ml) e curdlan, β -(1,3) glucana de alto peso molecular derivada de *Alcaligenes faecalis* (Sigma) nas concentrações de 0,4; 0,1 e 0,025 mg/ml, por 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada.

d) Tratamento por antagonistas: algumas culturas de macrófagos foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-TLR4 (10 µg/ml) (e-Bioscience), anti-CD11b (10 µg/ml) (e-Bioscience), e os anticorpos anti-MR (10 µg/ml) (Serotec), para promover o bloqueio dos receptores TLR4, CR3 (CD11b/CD18) e MR respectivamente. Os anticorpos foram incubados com os macrófagos por 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada.

2.5 Infecção e tratamento dos macrófagos para determinação de atividade fungicida

As leveduras de Pb foram suspensas em 2 mL de RPMI. Os macrófagos foram infectados com a suspensão de leveduras, em uma relação levedura-macrófago de 1:25 (CANO et al., 1992, 1994). Foi realizado o co-cultivo por 2 horas, as culturas foram lavadas e novamente incubadas por 48 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -70°C para determinar a presença de NO e citocinas.

Os cultivos de 48 horas foram lisados com água destilada (0,5ml), o processo repetido por mais três vezes, a suspensão recolhida, centrifugada, ressuspensa em 1,0 ml de RPMI e plaqueada em meio de cultura adequado para avaliar o número de fungos viáveis recuperados.

Para o estudo da função dos receptores MR, dectina-1, TLR4 e CR3 na atividade fungicida dos macrófagos, foram feitos os pré-tratamentos de algumas culturas de macrófagos com os agonistas e antagonistas dos receptores, como descrito anteriormente. A seguir foi feita a infecção com o Pb (1:25), e as culturas incubadas por um período adicional de 48 horas, seguindo o protocolo citado acima. A manana, laminarina, curdlan ou anticorpos anti-TLR4, anti-CD11b e anti-MR permaneceram nos co-cultivos de 48 h. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -70°C para determinar a presença de NO e citocinas, e os lisados foram usados para a determinação de UFC.

2.6 Infecção e tratamento dos macrófagos para determinação de fagocitose

Foi também realizado o co-cultivo por 4 horas para determinação de aderência/fagocitose. Os macrófagos foram infectados com o fungo numa relação fungo:macrófago 1:25 e após 4 horas de co-cultivo o sobrenadante da cultura foi removido, as células foram lavadas com meio RPMI. As lâminas foram fixadas com etanol absoluto e coradas com HE (Hematoxilina e Eosina - Newprov). A porcentagem de macrófagos contendo leveduras de *P.brasiliensis* e o número de leveduras por macrófago infectado foi determinada pela contagem de cinco campos de 200 macrófagos em aumento de 1000x.

Para o estudo da função do MR, dectina-1, TLR4 e CR3 na fagocitose por lamínulas, foram feitos os pré-tratamentos de algumas culturas de macrófagos com agonistas ou antagonistas como descrito anteriormente, e a seguir foi feita a infecção com o Pb (1:25) seguindo o protocolo acima.

2.7 Ensaio da Fagocitose por citometria de fluxo

A determinação da aderência/fagocitose também foi realizada através da análise por citometria de fluxo. Foi realizado o co-cultivo das culturas de macrófagos e fungos a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. A infecção foi realizada com leveduras não viáveis do fungo as quais foram previamente mortas pelo calor em banho-maria a 60°C por 30 minutos e isoladas por tratamento ultrassônico (3 ciclos de 15 segundos) em sonicador (Vibra cell VCX 750 - SONICS MATERIALS, INC., Newtown CT USA). As leveduras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi utilizado. Para a marcação do fungo utilizamos iodeto de propídio (PI) na concentração de 100 µg de PI (Sigma) para cada 1 mL de suspensão fúngica contendo 1×10^6 leveduras; a incubação foi feita por 30 minutos a 37 °C no escuro, de acordo com a técnica descrita por HATANO et al. (2009) e modificada por nosso grupo. A suspensão de fungos marcada com PI foi aliquoteada e armazenada em freezer - 70 °C para posterior utilização. Macrófagos foram infectados com o fungo marcado numa relação fungo:macrófago 1:1 e após 2 horas de co-cultivo o sobrenadante da cultura foi removido, as células foram lavadas com meio RPMI (Sigma-Aldrich) e retiradas das placas mantidas sobre o gelo com auxílio de um “scraper”. As células foram então colocadas em tubos Falcon, centrifugadas por 10 min. a 4 °C em 1200 rpm e o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de meio RPMI. A concentração de células foi ajustada para 1×10^6 células. A seguir, as células foram marcadas com 25 µL da solução do anticorpo anti-F4/80 (APC) na diluição adequada em tampão PBS. A aquisição das células (20.000 eventos) foi feita pelo FACS Calibur (BD Pharmingen®) utilizando o software Cell-Quest software (BD Pharmingen).

Para o estudo da influência dos receptores MR e dectina-1, na fagocitose de *P. brasiliensis* através da citometria de fluxo, foram feitos os pré-tratamentos de algumas culturas de macrófagos com a solução de manana ou solução de laminarina, conforme protocolo descrito anteriormente e posteriormente infectadas com as leveduras de *P. brasiliensis* marcadas com iodeto de propídio (PI) na concentração de 1 macrófago : 1 levedura, seguindo o protocolo de fagocitose descrito acima.

2.8 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As suspensões obtidas dos co-cultivos de 48h foram plaqueadas (100 µL/placa) em meio BHI-água com 5% de “fator de crescimento do fungo” e 4% de soro equino, especial para recuperação de *P. brasiliensis* viáveis (SINGER-VERMES et al., 1992). As placas foram

incubadas a 35 °C e as colônias contadas diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado.

2.9 Dosagem de NO

A concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes das co-culturas foi medida com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftiletilenodiamina, 2,5% H₃PO₄), sendo utilizado um volume de 50 µL do sobrenadante da cultura e igual volume do reagente de Griess. Foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e então determinada a absorbância em equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (leitor). A concentração de óxido nítrico foi determinada utilizando-se curva padrão padronizada com diferentes concentrações de nitrito de sódio (DING et al., 1988).

2.10 Caracterização das citocinas: ELISA para quantificação de IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β

A presença e concentração das citocinas (TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10 e TGF- β) produzidas pelos macrófagos peritoneais foram determinadas pelo método de ELISA, utilizando os kits OptEIA para citocinas (BD Biosciences). Neste método, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL por poço de anticorpo de captura diluído em tampão PBS, e incubadas por uma noite. Após 3 lavagens com 400 µL/poço de tampão de lavagem para ELISA, as placas foram bloqueadas com 300 µL/poço de tampão de bloqueio por 2 horas a temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para a curva padrão da citocina foram incubadas duplicatas de 50 µL/poço das diluições seriadas das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e padrões foi de 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada três vezes, 50 µL/poço de estreptoavidina foi adicionada e incubada por 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

2.11 Citometria de fluxo para caracterização da expressão de marcadores de membrana induzidos pelos diversos tratamentos dos macrófagos

Macrófagos peritoneais obtidos por lavado peritoneal conforme descrito anteriormente foram incubados por 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada, a seguir foram retirados os sobrenadantes das culturas e os macrófagos foram tratados ou não tratados com IFN- γ durante a noite. Após esse período, as culturas foram lavadas com meio RPMI. Algumas culturas de macrófagos foram tratadas com solução de manana (2,5 mg/ml) por 30 min. a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada. A seguir, as culturas foram infectadas com as leveduras de Pb (1:25). Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e cultivadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por um período adicional de 12 horas a 37 °C, 5% de CO₂. A seguir, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com meio RPMI e retiradas das placas sobre o gelo com auxílio de um “scraper” e transportadas para tubos Falcon. As células foram centrifugadas por 10 min. a 4 °C em 1200 rpm e o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de meio RPMI. Na marcação das populações celulares, foram colocadas 1x10⁶ células/orifício de uma placa de fundo redondo (96 orifícios, Costar). A placa foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi desprezado. Adicionaram-se 25 μ L do anticorpo F16/32 (bloqueador do FcR diluído 1:100) às células ressuspensas e em seguida foi feita incubação na geladeira (4 °C) por 20 minutos. Foram então adicionados 25 μ L da solução dos seguintes anticorpos: anti-F4/80 (APC), anti-IA^k (Pacific Blue), anti-CD11b (PercyPCy5.5), anti-CD11c (PECy7), anti-CD40 (FITC), anti-CD86 (FITC), anti-MR (PE), anti-Dectina-1 (PE), anti-DC-SIGN (PE), anti-TLR2 (PE) e anti-TLR4 (FITC) (BD Biociences) na combinação adequada para a população celular a ser analisada e nas diluições adequadas em tampão PBS com 0,1% de azida de sódio e 2% SBF; a incubação foi de 30 minutos no escuro (geladeira, 4 °C). A seguir a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L do mesmo tampão e nas mesmas condições já citadas anteriormente. As células resultantes foram ressuspensas em 200 μ L de uma solução de paraformaldeído a 1% para fixar o material, que era então armazenado em geladeira (4 °C) até sua análise em citômetro de fluxo BD FACSCanto. Após a aquisição dos dados, estes foram analisados utilizando o programa “FlowJo” com base na população de macrófagos, considerando-se o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) celular.

2.12 Análise estatística dos resultados

As comparações entre os diferentes tratamentos foram feitas utilizando análise de variância ou teste *t* de Student, dependendo do número de grupos. Foi utilizado o programa Prisma 4 (GraphPad Software). Como nível de significância foi considerado $p < 0,05$. Foi utilizado o software Fowjo para a análise da expressão dos receptores de membrana obtidos por FACS Canto (BD).

3 RESULTADOS

3.1 Influência do receptor de manose (MR) na interação de macrófagos com *P.brasiliensis*

3.1.1 Efeito da manana na fagocitose de *P. brasiliensis*

Os macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A foram previamente tratados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. A seguir, os macrófagos foram tratados com manana nas concentrações de 2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL por 30 min, e após este período, infectados com *P. brasiliensis* (relação Pb/MØ de 1/25) sobre lamínulas redondas em placa de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação a 37 °C, 5 % de CO² e atmosfera umidificada, o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram coradas com corante panótico e examinadas ao microscópio óptico comum. Foram contados cinco campos de 200 macrófagos em cada lamínula para determinar o número de fungos aderidos e/ou ingeridos após as 4 horas de incubação. Os resultados expressos na figura 1 mostram que macrófagos de camundongos B10.A têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras de *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de camundongos A/J. O tratamento com manana diminuiu expressivamente o número de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos dos camundongos B10.A; a diferença foi estatisticamente significativa tanto para as culturas sem tratamento como nas culturas pré-tratadas com IFN- γ . Não houve diferença estatisticamente significativa no número de fungos ingeridos e/ou aderidos aos macrófagos de camundongos A/J nas culturas tratadas por manana, quando comparadas às não tratadas com manana e nem na presença ou ausência de IFN- γ .

Figura 1. Avaliação da influência da manana na fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Os macrófagos peritoneais foram ativados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) e posteriormente tratados ou não com manana (2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL); foram então infectados com *P. brasiliensis* em uma relação fungo/Mo de 1:25 utilizando lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em microscópio óptico. Uma média de 1000 MØ foi contada e analisado o número de MØ com leveduras aderidas e/ou ingeridas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 lamínulas por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (*P < 0,05, **P < 0,01). (Experimento repetido 3 vezes).

3.1.2 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo

Os macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A foram previamente tratados ou não com a solução de manana na concentração de 2,5 mg/mL por 30 minutos a 37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada e posteriormente infectados com as leveduras de Pb marcadas com iodeto de propídio (PI) na concentração de 1 macrófago : 1 levedura. Após 2 horas de infecção o sobrenadante foi removido e as células ajustadas em 1×10^6 /mL e marcadas com anticorpo anti-F4/80 (APC). A leitura foi realizada imediatamente após a marcação em citômetro de fluxo FACsCalibur. O resultado expresso na figura 2 mostra que macrófagos de camundongos B10.A têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras de *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de camundongos A/J. O tratamento com manana diminuiu expressivamente o número de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos B10.A. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de fungos ingeridos e/ou aderidos aos macrófagos de camundongos A/J nas culturas tratadas por manana, quando comparadas às não tratadas. Os resultados obtidos no ensaio de fagocitose

com lâminulas mostrados anteriormente (Fig. 2) utilizando a manana nas culturas, foram equivalentes aos resultados obtidos no ensaio de fagocitose por citometria de fluxo.

Figura 2. Análise por citometria de fluxo da influência da manana na fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Os macrófagos peritoneais foram tratados ou não com manana (2,5 mg/mL) por 30 min; foram então infectados com *P. brasiliensis* marcados com iodeto de propídio (PI) na concentração de 1 macrófago : 1 levedura. Após 2 horas de infecção o sobrenadante foi removido, as células ajustadas para 1×10^6 /mL e marcadas com anticorpo anti- F4/80 (APC). A leitura foi realizada imediatamente após a marcação no FACsCalibur. As barras representam as médias $\pm$ EP de 3 amostras de cada tratamento por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (**P < 0,01). (Experimento repetido por três vezes).

3.2 Efeito do tratamento com Manana na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*

Estudamos também a influência da manana na atividade fungicida de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A previamente tratados ou não com IFN- γ durante a noite. Após este período, as culturas foram tratadas com manana derivada de *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações de 2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL por 30 minutos e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. A manana foi mantida durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 3, a presença de manana não alterou a capacidade fungicida de macrófagos não tratados pelo IFN- γ de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A). Mais uma vez observou-se menor recuperação de leveduras de macrófagos B10.A, uma vez que estas células de camundongos suscetíveis têm uma maior capacidade intrínseca de matar leveduras de *P. brasiliensis* (Pina et al., 2008). Em contraste, um menor número de fungos foi recuperado das culturas tratadas com IFN- γ de ambas as linhagens. A manana adicionada ao meio de cultura diminuiu significativamente a carga fúngica para ambas as linhagens, e os dados foram mais marcantes para a linhagem B10.A. Para esta linhagem houve redução da carga fúngica com as concentrações de 2,5 e 0,5 mg de manana/mL. Em macrófagos A/J somente a concentração mais alta induziu aumento da atividade fungicida.

Figura 3. Avaliação da influência da manana solúvel na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. A seguir foram tratadas ou não com manana nas concentrações de 2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL por 30 min, e então, infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram co-cultivadas por 48 horas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). (Experimento repetido por três vezes).

3.3 Efeito da manana na produção de NO

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo dos ensaios de atividade fungicida (48 h de cultivo). Sem o tratamento prévio com IFN- γ , não houve produção de NO. A figura 4 mostra que, após a ativação por IFN- γ , houve a produção de NO nas culturas de macrófagos de ambas as linhagens de camundongos, porém foi um pouco menor para os macrófagos da linhagem A/J. Houve um aumento da produção de NO nas culturas de macrófagos tratados com manana de uma maneira dose-resposta, tanto para macrófagos de camundongos A/J como de B10.A. Nas culturas de macrófagos infectados com o fungo e tratados com manana e IFN- γ houve uma produção ainda maior de NO quando comparadas às dos macrófagos não infectados, e nas mesmas condições de tratamento. Nos grupos controle correspondentes aos macrófagos não infectados com o fungo e tratados com IFN- γ houve uma pequena produção de NO.

Figura 4. Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 h de co-cultivo com *P. brasiliensis*. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite e no dia seguinte foram tratados ou não com manana (2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL) por 30 min, e infectados com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Os controles correspondem aos macrófagos sozinhos ou tratados com IFN- γ e macrófagos tratados com manana com ou sem IFN- γ . Nos grupos que não foram tratados com IFN- γ não houve produção de NO (dados não apresentados). Os dados representam a média $\pm$ EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001). (Experimento repetido por três vezes).

3.4 Dosagem de citocinas

3.4.1 Efeito da manana na produção de citocinas

A produção de citocinas pro-inflamatórias IL-12, TNF- α e, e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β por macrófagos foi estudada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, após 48 horas de cultivo com o fungo. As culturas de macrófagos foram infectadas ou não com *P. brasiliensis* e tratadas ou não com IFN- γ . Algumas culturas foram tratadas com manana altamente purificada derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, nas concentrações de 2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL. Houve produção estatisticamente maior de IL-12 pelas culturas de macrófagos de camundongos suscetíveis B10.A. Em contraste, com nenhum dos tratamentos empregados, observou-se a produção estatisticamente significativa de IL-12 nas culturas de macrófagos de camundongos resistentes A/J. As culturas de macrófagos dos camundongos B10.A tratadas com IFN- γ induziram maiores concentrações de IL-12 quando comparadas às culturas sem tratamento com IFN- γ (dados não mostrados); no entanto, ainda houve produção estatisticamente significativa de IL-12 na ausência de IFN- γ para a linhagem B10.A (Figura 5). O tratamento com manana, em todas as condições de cultivo, induziu uma maior produção de IL-12 quando comparado ao das culturas não tratadas com manana para a linhagem B10.A. Foi observado um efeito dose-resposta para todas as concentrações de manana utilizadas nas culturas de macrófagos da linhagem B10.A, infectados ou não com o fungo e na presença ou ausência de IFN- γ . Houve produção de TNF- α , IL-6, TGF- β e IL-10 nas culturas de macrófagos de camundongos resistentes A/J, e não houve produção de TNF- α , IL-6, TGF- β e IL-10 pelos macrófagos de camundongos suscetíveis B10.A, em todas as condições de cultivo (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Influência da manana na síntese de IL-12, TNF- α e IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com manana nas concentrações de 2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL e infectadas ou não com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-12, TNF- α e IL-6 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. Dados equivalentes obtidos com culturas pré-tratadas pelo IFN- γ (não mostrados). O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por três vezes).

Figura 6. Influência da manana na síntese de IL-10 e TGF- β por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com manana nas concentrações de 2,5, 0,5 e 0,1 mg/mL e infectadas ou não com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-10 e TGF- β foi avaliada no sobrenadante do cultivo. Dados equivalentes obtidos com culturas pré-tratadas pelo IFN- γ (não mostrados). O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por três vezes).

3.5 Efeito do tratamento com anticorpo anti-MR na fagocitose do fungo

Os macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A foram previamente tratados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. A seguir os macrófagos foram tratados com anticorpo monoclonal anti-receptor de manose na concentração de 10 μ g / mL por 30 min, e após este período, infectados com *P. brasiliensis* (relação Pb/MØ de 1/25) sobre lamínulas redondas em placa de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação a 37 °C, 5 % de CO₂ e atmosfera umidificada, o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram coradas com corante panótico e examinadas ao microscópio óptico comum. Uma média de 1000 macrófagos foi contada em cada lamínula para determinar o número de fungos aderidos e/ou ingeridos após as 4 horas de incubação. Os resultados expressos na figura 7 mostram que macrófagos de camundongos B10.A têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras

de *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de camundongos A/J. O tratamento com anti-MR diminuiu expressivamente o número de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos de ambas as linhagens; a diferença foi estatisticamente significativa para os macrófagos das culturas pré-tratadas com IFN- γ em ambas as linhagens. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de fungos ingeridos e/ou aderidos aos macrófagos nas culturas tratadas por anti-MR na ausência de IFN- γ .

Figura 7. Avaliação da influência do anticorpo anti-MR na fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Os macrófagos peritoneais foram ativados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) e posteriormente tratados ou não com anticorpo anti-MR (10 μ g/mL); foram então infectados com *P. brasiliensis* em uma relação fungo/MØ de 1: 25 utilizando lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em microscópio óptico. Uma média de 1000 MØ foi contada e analisado o número de MØ com leveduras aderidas e/ou ingeridas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 lamínulas por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (*P < 0,05, **P < 0,01). (Experimento repetido por três vezes).

3.6 Efeito do bloqueio do MR com anticorpo anti-MR na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*

Analizamos a influência do bloqueio do MR com anticorpo anti-MR na atividade fungicida nas culturas de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A previamente tratadas ou não com IFN- γ durante a noite. Após este período, as culturas foram tratadas com anticorpos anti-MR na concentração de 10 μ g/mL por 30 minutos e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. O anticorpo anti-MR foi mantido durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 8, o bloqueio com anti-MR diminuiu a capacidade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A). Obtivemos maior recuperação de

leveduras viáveis provenientes de macrófagos de camundongos A/J. Não houve diferença significativa na recuperação de fungos após o bloqueio com anticorpos anti-MR na ausência de IFN- γ . Em contraste, a adição do anticorpo anti-MR nas culturas tratadas com IFN- γ aumentou a carga fúngica para ambas as linhagens, quando comparados aos grupos controles tratados com IFN- γ , e os dados foram mais marcantes para a linhagem A/J.

Figura 8. Avaliação do bloqueio dos MR com anticorpos monoclonais anti-MR na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com IFN- γ (20.000pg/mL) durante a noite. A seguir foram tratadas ou não com anticorpo anti-MR na concentração 10 μ g/mL por 30 min, e após este período, infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram cultivadas por 48 horas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por três vezes).

3.7 Efeito do anticorpo anti-MR na produção de NO

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo dos ensaios de atividade fungicida (48 h de co-cultivo). Nas culturas sem tratamento com IFN- γ houve menor produção de NO quando comparadas às ativadas por IFN- γ . A figura 9 mostra que, após a ativação por IFN- γ , houve a produção de NO nas culturas de macrófagos de ambas as linhagens de camundongos, porém foi menor para os macrófagos da linhagem A/J. Houve uma diminuição da produção de NO nas culturas de macrófagos tratados com anti-MR, tanto para macrófagos de camundongos A/J como de B10.A. Nos grupos controle correspondentes aos macrófagos não infectados com o fungo e tratados ou não com IFN- γ houve uma pequena produção de NO.

Figura 9. Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 h de co-cultivo com *P. brasiliensis*. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite e no dia seguinte foram tratados ou não com anticorpo anti-MR (10 μ g/mL) por 30 min, e infectados com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Os controles correspondem aos macrófagos sozinhos ou tratados com IFN- γ . Os dados representam a média $\pm$ EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por três vezes).

3.8 Dosagem de citocinas

3.8.1 Efeito do bloqueio do MR com anticorpo anti-MR na produção de citocinas

A produção de citocinas pro-inflamatórias IL-12, TNF- α e IL-6, e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β foi medida dos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, após 48 horas de cultivo. Algumas culturas de macrófagos foram cultivadas com a adição de IFN- γ durante a noite. Algumas culturas de macrófagos foram tratadas com anticorpo anti-MR na concentração de 10 μ g/mL e infectadas ou não com *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Verificamos que o bloqueio do MR com anticorpo anti-MR levou à inibição de todas as citocinas pró-inflamatórias analisadas, enquanto que houve aumento da citocina anti-inflamatória TGF- β após o bloqueio com anti-MR pelos macrófagos A/J (Figura 10). Repetiram-se aqui os achados anteriormente descritos com a manana: camundongos B10.A sintetizam IL-12 e baixos níveis de IL-10 enquanto que camundongos A/J sintetizam altos níveis de TNF- α , IL-6 e TGF- β . O tratamento com anti-MR inibiu significativamente as citocinas produzidas por macrófagos de camundongos A/J e B10.A quando estas células eram previamente estimuladas por IFN- γ (Figura 10). Neste experimento mais uma vez verificamos a intrínseca capacidade

de macrófagos de camundongos A/J de sintetizar TGF- β , e aumento ainda mais proeminente após o bloqueio com anticorpo anti-MR.

Figura 10. Efeito do bloqueio dos MRs por anticorpos anti-MR na produção de IL-12, TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β . Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com anticorpos anti-MR (10 μ g/mL) e infectadas com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Dados não significativos obtidos com culturas não-tratadas pelo IFN- γ (não mostrados). Após 48 horas de incubação a produção de IL-10 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). (Experimento repetido por três vezes).

3.9 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na fagocitose de *P. brasiliensis*

Vários trabalhos têm demonstrado que o TLR4 além de reconhecer LPS, o seu agonista padrão, também interage com substâncias que expressam manose, porém ligadas através de manose O-ligadas além de fosfomanana. O receptor CR3 (CD11b/CD18), além de reconhecer o componente iC3b do sistema complemento também está envolvido no reconhecimento de vários carboidratos como resíduos de manose, fucose e glucanas. Assim, investigamos a influência do bloqueio dos receptores CR3 e TLR4 na interação dos macrófagos com *P. brasiliensis*. Os macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A foram tratados com anticorpos monoclonais anti-CD11b e anti-TLR4 na concentração de 10 µg / mL por 30 min, e após este período, infectados com *P. brasiliensis* (relação Pb/MØ de 1/25). O ensaio de fagocitose foi realizado como anteriormente descrito. Os resultados expressos na figura 11 mostram que macrófagos de camundongos B10.A têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras de *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de camundongos A/J. O tratamento com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 diminuiu expressivamente o numero de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos dos camundongos A/J e B10.A. Houve inibição mais proeminente da atividade fagocítica pelos macrófagos de camundongos A/J após o bloqueio por anticorpos anti-CD11b.

Figura 11. Avaliação da influência dos anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Os macrófagos peritoneais foram tratados ou não com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 (10 µg/mL); foram então infectados com *P. brasiliensis* em uma relação fungo/MØ de 1: 25 utilizando lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em microscópio óptico. Uma média de 1000 MØ foi contada e analisado o número de MØ com leveduras aderidas e/ou ingeridas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 lamínulas por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). (Experimento repetido por três vezes).

3.10 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*

Avaliamos o efeito do bloqueio dos receptores CR3 e TLR4 na atividade fungicida de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A. As culturas foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-CD11b anti-TLR4 na concentração de 10 µg/mL por 30 minutos e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. Os anticorpos foram mantidos durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 12, o bloqueio com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 diminuiu a carga fungica obtida no ensaio de CFU, no entanto a menor recuperação de fungos encontrada parece não estar correlacionada com a capacidade fungicida, uma vez que no ensaio de fagocitose encontramos menor aderência e/ou ingestão de fungos após o bloqueio com anticorpos anti-TLR4 e anti-CD11b. Podemos sugerir que o bloqueio dos receptores CR3 e TLR4 com os anticorpos reduziu a capacidade de ligação do fungo a estes receptores, o qual poderia explicar a menor recuperação de fungos encontrada

pelos macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A), e os dados foram mais marcantes para a linhagem A/J.

Figura 12. Efeito do bloqueio dos receptores CR3 e TLR4 com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com anticorpos anti-CD11b anti-TLR4 na concentração 10 µg/mL por 30 min, e após este período, infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram cultivadas por 48 horas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por três vezes).

3.11 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 na produção de NO

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo dos ensaios de atividade fungicida (48 h de cultivo) sob a influência dos anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4. A figura 13 mostra que houve a produção de NO nas culturas de macrófagos de ambas as linhagens de camundongos, porém foi menor para os macrófagos da linhagem A/J. Não houve diminuição significativa da produção de NO para ambas as linhagens após o bloqueio com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4.

Figura 13. Efeito do bloqueio dos receptores CR3 e TLR4 por anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 h de co-cultivo com *P. brasiliensis*. Macrófagos foram tratados ou não com anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 (10 µg/mL) por 30 min, e infectados com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Os controles correspondem aos macrófagos sozinhos ou tratados com IFN- γ . Os dados representam a média $\pm$ EP de 5 poços por grupo. (Experimento repetido por três vezes).

3.12 Efeito do bloqueio dos receptores CR3 (CD11b/CD18) e TLR4 na produção de citocinas

Avaliamos a influência do bloqueio dos receptores CR3 e TLR4 na produção de citocinas nas culturas de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A. Algumas culturas foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-CD11b e anti-TLR4 na concentração de 10 µg/mL por 30 minutos e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. Foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-6 e TNF- α e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β obtida dos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, após 48 horas de cultivo (Figura 14). Ao avaliarmos o perfil de citocinas pró-inflamatório, verificamos ausência da produção de IL-12, aumento de IL-6 e diminuição de TNF- α pelos macrófagos de camundongos A/J após o bloqueio com anti-CD11b e anti-TLR4. Em macrófagos de camundongos B10.A, encontramos diminuição da produção da citocina IL-12, aumento de IL-6 e ausência de TNF- α após o bloqueio com anti-CD11b e anti-TLR4. O perfil de citocinas anti-inflamatório mostrou diminuição da produção de IL-10 e aumento de TGF- β nas culturas de macrófagos de camundongos A/J, em contraste, houve

maior produção de IL-10 e ausência de TGF- β pelos macrófagos de camundongos B10.A após o bloqueio de CR3 e TLR4 (Figura 14).

Figura 14. Efeito do bloqueio dos receptores CD11b e TLR4 por anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 na produção de IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β . Os macrófagos foram cultivados em meio de cultura RPMI. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com os anticorpos anti-CD11b e anti-TLR4 (10 μ g/mL) e infectadas com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção das citocinas foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). (Experimento repetido por três vezes).

3.13 Análise da expressão dos marcadores de membrana de macrófagos controles - não infectados pelo *P. brasiliensis* e não tratados com manana

Para melhor caracterizarmos as populações celulares realizamos a análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores de membrana de macrófagos não infectados e não tratados (controles) de camundongos A/J e B10.A (Figura 15). Os valores obtidos foram determinados em MFI e em porcentagem. Foram comparados os valores entre as duas linhagens A/J, versus B10.A. Podemos observar que houve maior expressão dos receptores de manose MR e dectina-1 pelos macrófagos de camundongos A/J quando comparado aos macrófagos de camundongos B10.A. Houve maior expressão dos receptores DC-SIGN, TLR4 e TLR2, e das moléculas CD11b, CD11c, F4/80, CD86 e CD40 pelos macrófagos de camundongos B10.A quando comparado aos macrófagos controles de camundongos A/J. O tratamento com IFN- γ induziu maior expressão das moléculas e obedeceu ao mesmo padrão de ativação quando na ausência de IFN- γ (dados não mostrados).

Figura 15. Análise da intensidade média de fluorescência (MFI) e da porcentagem dos marcadores de membrana presentes em macrófagos peritoneais não infectados e não-tratados (controles), de camundongos A/J e B10.A por citometria de fluxo. As barras representam as médias $\pm$ EP de 3 amostras de cada tratamento por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença

estatisticamente significativa entre os grupos tratados e não tratados com manana (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por duas vezes).

3.14 Influência da manana na expressão de marcadores de membrana de macrófagos infectados ou não pelo *P. brasiliensis*

Os macrófagos peritoneais de camundongos pré-inoculados com tioglicolato foram obtidos por lavado peritoneal e cultivados em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/mL, estimulados ou não com IFN- γ durante a noite e tratados ou não-tratados com manana por 30 min, e posteriormente infectados ou não-infectados com Pb numa relação Pb : macrófagos (1:25) por um período de 12 horas. Para realizarmos a caracterização fenotípica dos macrófagos de camundongos A/J e B10.A foi analisada a expressão dos marcadores de membrana F4/80, CD11b, CD11c, CD86, CD40, IA^k, MR, TLR4, TLR2, Dectina-1 e DC-SIGN. A figura 16 mostra o perfil de ativação dos macrófagos através da determinação da intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores expressos na superfície de membrana dos macrófagos de camundongos A/J. Ao analisarmos a expressão dos marcadores em função ao tratamento com manana, observamos que houve diminuição da expressão de MR, TLR2, CD11c, F4/80, CD40 e CD86 pelo tratamento dos macrófagos A/J com manana. Não houve diferença significativa na expressão de TLR4, dectina-1, CD11b e IA^k após o tratamento com manana pelos macrófagos de camundongos A/J comparado aos controles. Em macrófagos ativados por IFN- γ obtivemos resultados semelhantes (dados não mostrados). Ao analisarmos a expressão dos marcadores em macrófagos infectados pelo *P. brasiliensis* observamos diminuição da expressão de TLR2 e CD86 e aumento da expressão de CD40 e dectina-1 pelos macrófagos de camundongos A/J comparado aos controles. Não houve diferença significativa na expressão dos outros marcadores após a infecção pelo o fungo comparado aos controles. O tratamento com IFN- γ induziu maior expressão das moléculas e obedeceu ao mesmo padrão de ativação quando na ausência de IFN- γ (dados não mostrados).

Figura 16. Análise da intensidade média de fluorescência (MFI) dos receptores MR, DC-SIGN, TLR4, TLR2, Dectina-1, CD11b, CD11c e dos marcadores constitutivos e de ativação F4/80, IA^k, CD40 e CD86 presentes em macrófagos peritoneais de camundongos A/J tratados ou não tratados com manana (2,5mg/mL) e infectados ou não-infectados com Pb. As barras representam as médias $\pm$ EP de 3 amostras de cada tratamento por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e não tratados com manana (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (Experimento repetido por duas vezes).

A análise do perfil de ativação dos macrófagos de camundongos B10.A foi realizada por citometria de fluxo, através da determinação da intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores expressos na superfície de membrana dos macrófagos (Figura 17). Ao analisarmos os macrófagos de camundongos B10.A, observamos que o tratamento com manana em macrófagos não-infectados levou à diminuição da expressão de TLR2, CD11b, CD11c, CD40 e dectina-1 quando comparados aos controles. Os macrófagos B10.A

infectados pelo *P. brasiliensis* mostraram diminuição da expressão de TLR4, TLR2, CD11b, CD11c, IA^k, CD40 e dectina-1, comparados aos controles. O tratamento com IFN- γ na presença de manana ou *P. brasiliensis* também levou a diminuição da MFI destes marcadores em ambas as linhagens (dados não mostrados).

Figura 17. Análise da intensidade média de fluorescência (MFI) dos receptores MR, DC-SIGN, TLR4, TLR2, Dectina-1, CD11b, CD11c e dos marcadores constitutivos e de ativação F4/80, IA^k, CD40 e CD86 presentes em macrófagos peritoneais de camundongos B10.A tratados ou não tratados com manana (2,5mg/mL) e infectados ou não-infectados com Pb. As barras representam as médias $\pm$ EP de 3 amostras de cada tratamento por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e não tratados com manana (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

Os valores mais expressivos encontrados, correspondentes aos gráficos de barras analisados anteriormente, foram também representados através da sobreposição de gráficos de histogramas, indicando a intensidade média de fluorescência MFI das subpopulações de

macrófagos de camundongos A/J e B10.A (Figura 18). Os histogramas comparam os valores de MFI de F4/80, CD40, CD86, TLR4, TLR2 e DC-SIGN entre as duas linhagens de macrófagos A/J e B10.A tratados e não tratados com manana. Não foram colocados todos os histogramas correspondentes a cada tratamento como demonstrado pelos gráficos de barras, mas apenas aqueles que deram resultados mais expressivos. Por outro lado, podemos observar que os macrófagos da linhagem B10.A estimulados por manana apresentaram maior intensidade média de fluorescência para os marcadores F4/80, CD40, CD86, TLR4, TLR2 e DC-SIGN em comparação aos macrófagos da linhagem A/J. Sem a estimulação por manana os macrófagos B10.A parecem apresentar maior expressão de F4/80 comparado aos macrófagos A/J.

Figura 18. Marcadores de membrana de macrófagos: comparação entre linhagens e efeito da manana. Sobreposição dos histogramas indicando a intensidade média de fluorescência das subpopulações de macrófagos de camundongos A/J e B10.A, determinada através de um “gate” levando em consideração o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células. Intensidade de fluorescência de F4/80, CD40, CD86, TLR4, e TLR2 de macrófagos não-

tratados (MØ) e macrófagos tratados com manana (MØ+MANANA) (2,5 mg/mL). A linha tracejada corresponde a intensidade média de fluorescência de macrófagos de camundongos A/J, a linha contínua corresponde aos macrófagos de camundongos B10.

Comparamos também as amostras de macrófagos tratados com manana e seus controles não tratados, dentro da mesma linhagem [Figura 19 (a)]. Ao analisarmos as amostras da linhagem A/J observamos que a manana levou à diminuição da expressão de F4/80, CD86, CD11c, TLR2 e TLR4 pelos macrófagos. Na figura 19 (b) analisamos as amostras da linhagem B10.A, e observamos que a manana causou diminuição da expressão de CD40, TLR2 e Dectina-1 pelos macrófagos.

Figura 19 (a). Expressão de marcadores de membrana de macrófagos. Influência do tratamento com manana. Sobreposição dos histogramas indicando a intensidade média de fluorescência das subpopulações de macrófagos de camundongos A/J determinada através de um “gate” levando em consideração o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células. Intensidade de fluorescência de macrófagos A/J tratados ou não com manana expressando F4/80,

CD86, CD11c, TLR2 e TLR4. (b) intensidade média de fluorescência das subpopulações de macrófagos de camundongos B10.A tratados ou não com manana expressando expressando CD40, TLR2 e DECTINA-1. A linha tracejada corresponde aos controles (MØ) e a linha preenchida corresponde aos macrófagos tratados com manana (MØ+MANANA).

Na figura 20 (a) foram comparadas amostras de macrófagos A/J infectados pelo Pb com seus controles não infectados dentro da mesma linhagem. Observamos que houve aumento da expressão de CD40 e DECTINA-1, porém diminuição de CD86 e TLR4 pelos macrófagos A/J infectados pelo Pb. Na figura 20 (b) foram comparadas amostras de macrófagos B10.A infectados pelo Pb com seus controles. Observamos que houve aumento da expressão de CD40 e Dectina-1, porém diminuição da expressão de TLR2 pelos macrófagos infectados da linhagem B10.A.

Figura 20 (a). Efeito da interação de macrófagos com *P. brasiliensis* na expressão de marcadores de membrana de macrófagos. Sobreposição dos histogramas indicando a intensidade média de fluorescência MFI das subpopulações de macrófagos de camundongos A/J determinada através de um “gate” levando em consideração o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células. Intensidade de fluorescência de macrófagos A/J infectados ou não infectados pelo Pb expressando CD40, CD86, TLR4 e DECTINA-1. (b) intensidade média de fluorescência de macrófagos B10.A infectados ou não infectados pelo Pb expressando CD40, TLR2 e

DECTINA-1. A linha a linha contínua corresponde aos controles (MO) e a linha tracejada corresponde aos macrófagos infectados com Pb (MO+Pb).

3.15 Influência do receptor Dectina-1 na interação dos macrófagos com *P. brasiliensis*

3.15.1 Efeito da laminarina na fagocitose de *P. brasiliensis*

Os macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A foram previamente tratados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. A seguir os macrófagos foram tratados com laminarina obtida de laminaria digitata (Sigma) nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL por 30 min, e após este período, infectados com *P. brasiliensis* (relação Pb/MØ de 1/25) sobre lamínulas redondas em placa de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação a 37 °C, 5 % de CO² e atmosfera umidificada o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram coradas com corante panótico e examinadas ao microscópio óptico comum. Uma média de 1000 macrófagos foi contada em cada lamínula para determinar o número de fungos aderidos e/ou ingeridos após as 4 horas de incubação. Os resultados expressos na figura 21 mostram que macrófagos de camundongos B10.A têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras de *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de camundongos A/J. O tratamento com laminarina diminuiu expressivamente o número de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos dos camundongos A/J; a diferença foi estatisticamente significativa tanto para as culturas sem tratamento como nas culturas pré-tratadas com IFN- γ . Houve aumento de fungos aderidos e/ou ingeridos nas culturas de camundongos B10.A tratadas com laminarina sem tratamento com IFN- γ , mas não nas culturas tratadas por laminarina e IFN- γ .

Figura 21. Avaliação da influência da laminarina na fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Os macrófagos peritoneais foram ativados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) e posteriormente tratados ou não com laminarina (0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL); foram então infectados com *P. brasiliensis* em uma relação fungo/Mo de 1: 25 utilizando lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em microscópio óptico. Uma média de 1000 MØ foi contada e analisado o número de MØ com leveduras aderidas e/ou ingeridas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 lamínulas por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). (Experimento repetido 2 vezes).

3.15.2 Efeito do tratamento com laminarina na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*

Analizamos também a influência da laminarina na atividade fungicida das culturas de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A previamente estimulados ou não com IFN- γ durante a noite. Após este período, as culturas foram tratadas com laminarina (0,8; 0,2; 0,05 mg/ml) por 30 minutos e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. A laminarina foi mantida durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 22, a presença de laminarina aumentou a carga fúngica recuperada de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e ocorreu tanto para as culturas tratadas com IFN- γ quanto para as não tratadas. Ao contrário, houve uma diminuição da carga fúngica para os macrófagos B10.A após o tratamento com laminarina. Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade fungicida nas culturas de macrófagos B10.A tratados laminarina na presença de IFN- γ quando comparados aos seus controles. Comparando-se macrófagos A/J e B10.A, mais uma vez observou-se menor recuperação de leveduras de macrófagos B10.A, uma vez que estas células

de camundongos suscetíveis têm uma maior capacidade intrínseca de matar leveduras de *P. brasiliensis* (Pina et al., 2008). Além disso, um menor número de fungos foi recuperado das culturas tratadas com IFN- γ de ambas as linhagens. A laminarina adicionada ao meio de cultura aumentou a carga fúngica para a linhagem A/J nas concentrações de 0,8 e 0,2 mg/mL, sem tratamento com IFN- γ , porém, após o tratamento com IFN- γ , houve aumento da carga fúngica apenas com a concentração de 0,8 mg/mL. Para macrófagos da linhagem B10.A sem tratamento com IFN- γ houve redução da carga fúngica nas culturas tratadas com laminarina nas concentrações de 0,8 e 0,2 mg/mL.

Figura 22. Avaliação da influência da laminarina na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com IFN- γ (20.000pg/mL) durante a noite. A seguir foram tratadas ou não com laminarina nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL por 30 min, e após este período, infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram cultivadas por 48 horas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). (Experimento repetido por três vezes).

3.15.3 Efeito da laminarina na produção de NO

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo dos ensaios de atividade fungicida (48 h de cultivo). A figura 23 demonstra que a laminarina potencia a síntese de NO induzida por IFN- γ e isso ocorre tanto para macrófagos de camundongos A/J como B10.A. Nas culturas infectadas e sem tratamento com IFN- γ houve pequena produção de NO. Entretanto para as culturas pré-tratadas com IFN- γ de camundongos A/J e B10.A houve um aumento

estatisticamente significativa na produção de NO pela adição de laminarina nas concentrações de 0,8 e 0,2 mg/mL. Nossos demonstram que não houve correlação entre os dados de atividade fungicida alterados pela laminarina e a produção de NO.

a) sem Pb

b) com Pb

Figura 23. Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 h de co-cultivo com *P. brasiliensis*. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN-γ (20.000 pg/mL) durante a noite e no dia seguinte foram tratados ou não com laminarina (0,8; 0,2 e 0,05 mg/mL) por 30 min, e infectados com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Os controles correspondem aos macrófagos sozinhos ou tratados com IFN-γ e macrófagos tratados com laminarina com ou sem IFN-γ. Os dados representam a média ± EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001). (Experimento repetido 2 vezes)

3.16 Efeito da laminarina na produção de citocinas

3.16.1 Efeito a laminarina na produção de IL-6

Para melhor interpretação dos nossos resultados, analisamos o efeito da laminarina na produção de citocinas. A análise da produção da citocina IL-6 obtida dos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, após 48 horas de cultivo foi realizada (Figura 24). Houve produção estatisticamente significativa de IL-6 nas culturas de macrófagos provenientes de ambas as linhagens, resistentes A/J e suscetíveis B10.A, porém os níveis de citocinas IL-6 produzidos pelos camundongos resistentes foram maiores do que para os suscetíveis. A produção de IL-6 mostrou ser independente de IFN- γ para ambas as linhagens. O tratamento com laminarina, em todas as condições de cultivo, induziu uma maior produção de IL-6 quando comparado ao das culturas não tratadas com laminarina. Foi observado um efeito dose-resposta para as concentrações de laminarina utilizadas. No entanto, nas culturas de macrófagos de ambas as linhagens infectadas ou não com o fungo, mas sem tratamento com IFN- γ , houve aumento estatisticamente significativo de IL-6 apenas nas concentrações de 0,8 e 0,2 mg/mL de laminarina utilizadas.

a) sem IFN- γ b) com IFN- γ

Figura 24. Influência da laminarina na síntese de IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com laminarina nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-6 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Experimento repetido 2 vezes.

3.16.2 Efeito da laminarina na produção de IL-12

Análise da produção da citocina IL-12 obtida dos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, tratados com laminarina nas mesmas condições de cultivo citadas anteriormente (Figura 25). Houve produção

estatisticamente maior de IL-12 nas culturas de macrófagos provenientes de camundongos suscetíveis B10.A. Não houve produção estatisticamente significativa de IL-12 nas culturas de macrófagos provenientes da linhagem resistente A/J em nenhum dos tratamentos empregados. Para macrófagos de camundongos B10.A, a laminarina induziu maior produção de IL-12, fossem eles tratados ou não por IFN- γ , infectados ou não pelo fungo. Foi observado um efeito dose-resposta para as concentrações de laminarina utilizadas nas culturas de macrófagos da linhagem B10.A (Figura 25).

Figura 25. Influência da laminarina na síntese de IL-12 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com laminarina nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-12 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Experimento repetido 2 vezes.

3.16.3 Efeito da laminarina na produção de TNF- α

Houve produção estatisticamente significativa de TNF- α somente nas culturas de macrófagos provenientes de camundongos resistentes A/J (Figura 26). Os macrófagos A/J tratados ou não com IFN- γ produziram elevadas concentrações de TNF- α . Foi observado um efeito dose-resposta para as concentrações de 0,2 e 0,8 mg/mL de laminarina utilizadas nas culturas de macrófagos da linhagem A/J, infectadas ou não com o fungo e na presença ou ausência de IFN- γ . Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de TNF- α na concentração de 0,05 mg/ml de laminarina empregada.

Figura 26. Influência da laminarina na síntese de TNF- α por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com laminarina nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação

a produção de TNF- α foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001). Experimento repetido 2 vezes

3.16.4 Efeito da laminarina na produção de IL-10

As culturas de macrófagos dos camundongos de ambas as linhagens apresentaram elevada produção de IL-10 tanto na presença quanto na ausência IFN- γ , no entanto foram mais expressivas na presença de IFN- γ (Figura 27). O tratamento com laminarina induziu diminuição dos níveis de IL-10 pelos macrófagos de ambas as linhagens de camundongos. Para os macrófagos A/J os níveis de IL-10 diminuíram nas concentrações de 0,2 e 0,8 mg/mL de laminarina utilizada na presença de IFN- γ e somente nas culturas infectadas com o fungo. Para as culturas de A/J não tratadas com IFN- γ e infectadas ou não infectadas com o fungo houve diminuição dos níveis de IL-10 somente na concentração de 0,8 mg/mL de laminarina. A linhagem B10.A apresentou diminuição mais expressiva da produção de IL-10 quando comparado com a linhagem A/J nas culturas tratadas com 0,2 e 0,8 mg/mL de laminarina, infectadas ou não, e tratadas ou não tratadas com IFN- γ . Foi observado um efeito dose-resposta para as concentrações de 0,2 e 0,8 mg/mL de laminarina utilizadas.

b) sem IFN- γ a) com IFN- γ

Figura 27. Influência da laminarina na síntese de IL-10 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com laminarina nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-10 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Experimento repetido 2 vezes.

3.16.5 Efeito da laminarina na produção de TGF- β

As culturas de macrófagos infectados ou não infectados dos camundongos A/J apresentaram elevada produção de TGF- β tanto na presença quanto na ausência IFN- γ ; no entanto, foram mais expressivas na presença de IFN- γ (Figura 28). O tratamento com laminarina não induziu diferença estatisticamente significativa na produção de TGF- β nas culturas de macrófagos de camundongos A/J não tratados com IFN- γ . A laminarina induziu elevado aumento na produção de TGF- β nas culturas de macrófagos de camundongos A/J infectados ou não-infectados com o fungo e tratadas com IFN- γ nas concentrações de 0,2 e 0,8 mg/mL de laminarina. Não houve produção estatisticamente significativa de TGF- β pelos macrófagos da linhagem B10.A em todas as condições de cultivo.

a) sem IFN- γ

b) com IFN- γ

Figura 28. Influência da laminarina na síntese de TGF- β por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com laminarina nas concentrações de 0,8, 0,2 e 0,05 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação

a produção de TGF- β foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$). Experimento repetido 2 vezes.

3.17 Efeito do curdlan na fagocitose de *P. brasiliensis*

Os macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A foram previamente tratados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. A seguir os macrófagos foram tratados com curdlan nas concentrações de 0,4, 0,1 e 0,025 mg/mL por 30 minutos, e após este período, infectados com *P. brasiliensis* (relação Pb/MØ de 1/25) sobre lamínulas redondas em placa de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação a 37 °C, 5 % de CO² e atmosfera umidificada o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram coradas com corante panótico e examinadas ao microscópio óptico comum. Uma média de 1000 macrófagos foi contada em cada lamínula para determinar o número de fungos aderidos e/ou ingeridos após as 4 horas de incubação. Os resultados expressos na figura 29, corroboram os anteriores e demonstram que macrófagos de camundongos B10.A têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras de *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de camundongos A/J. O tratamento com curdlan diminuiu expressivamente o número de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos dos camundongos A/J; a diferença foi estatisticamente significativa tanto para as culturas sem tratamento como nas culturas pré-tratadas com IFN- γ . Houve diminuição de fungos aderidos e/ou ingeridos nas culturas de camundongos B10.A tratadas com curdlan e IFN- γ . Não houve diferença estatisticamente significativa no número de fungos ingeridos e/ou aderidos aos macrófagos de camundongos B10.A nas culturas tratadas por laminarina sem IFN- γ .

Figura 29. Avaliação da influência de Curdlan na fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Os macrófagos peritoneais foram ativados ou não com IFN-γ (20.000 pg/mL) e posteriormente tratados ou não com curdlan (0,4; 0,1 e 0,025 mg/mL); foram então infectados com *P. brasiliensis* em uma relação fungo/MØ de 1: 25 utilizando lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em microscópio óptico. Uma média de 1000 MØ foi contada e analisado o número de MØ com leveduras aderidas e/ou ingeridas. As barras representam as médias ± EP de 5 lamínulas por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (*P < 0,05, **P < 0,01).). Experimento repetido 2 vezes.

3.18 Efeito do tratamento com curdlan na atividade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis ao *P. brasiliensis*

Analizamos também a influência do curdlan na atividade fungicida nas culturas de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A previamente estimulados ou não com IFN-γ durante a noite. Após este período, as culturas foram tratadas com curdlan β-(1,3) glucana derivada de *Alcaligenes faecalis* (Sigma) (0,4, 0,1 e 0,025 mg/ml) por 30 minutos e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. O curdlan foi mantido durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 30, a presença de curdlan aumentou a capacidade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e ocorreu tanto para as culturas tratadas com IFN-γ quanto para as não tratadas. Ao contrário, houve uma diminuição da capacidade fungicida para os camundongos suscetíveis (B10.A) após o tratamento com curdlan, no entanto, foi estatisticamente significativa apenas na presença de IFN-γ. Um menor número de fungos foi recuperado das culturas tratadas com IFN-γ de ambas as linhagens. O curdlan adicionado ao meio de cultura diminuiu a carga fúngica da linhagem A/J nas

concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL tanto nas culturas tratadas quanto nas não tratadas com IFN- γ , onde podemos observar um efeito dose-resposta. Em contraste, houve aumento da carga fúngica nas culturas dos camundongos B10.A nas concentrações de 0,4, 0,1 e 0,025 mg curdlan/mL tratadas com IFN- γ ; observamos então, um efeito-dose resposta com as maiores concentrações empregadas. Não houve diferença estatisticamente significativa na recuperação de fungos nas culturas de camundongos B10.A tratadas com curdlan na ausência de IFN- γ (Figura 30).

Figura 30. Avaliação da influência de curdlan na atividade fungicida de macrófagos de camundongos A/J e B10.A. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com IFN- γ (20.000pg/mL) durante a noite. A seguir foram tratadas ou não com curdlan nas concentrações de 0,4; 0,1 e 0,025 mg/mL por 30 min, e após este período, infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram cultivadas por 48 horas. As barras representam as médias $\pm$ EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (* P < 0,05 e ** P < 0,01). Experimento repetido por três vezes.

3.19 Efeito do curdlan na produção de NO

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo dos ensaios de atividade fungicida (48 h de cultivo). Curdlan induziu aumento da produção de NO em ambos os macrófagos A/J e B10.A, e ocorreu tanto nas culturas infectadas quanto nas não infectadas pelo *P. brasiliensis* (figura 31). Houve um efeito dose-resposta da produção de NO para as todas as concentrações de curdlan utilizadas, tanto na presença quanto na ausência de IFN- γ , no entanto a produção maior de NO ocorreu nas culturas tratadas com IFN- γ .

a) sem Pb

b) com Pb

Figura 31. Quantificação de NO sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos A/J e B10.A após 48 h de co-cultivo com *P. brasiliensis*. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite e no dia seguinte foram tratados ou não com curdlan (0,4; 0,1 e 0,025 mg/mL) por 30 min, e infectados com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Os controles correspondem aos macrófagos sozinhos ou tratados com IFN- γ e macrófagos tratados com curdlan com ou sem IFN- γ . Os dados representam a média $\pm$ EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Experimento repetido 2 vezes.

3.20 Efeito do Curdlan na produção de citocinas

3.20.1 Efeito do Curdlan na produção de IL-6

Avaliação do efeito do curdlan na produção da citocina IL-6 obtidas dos sobrenadantes de cultura de macrófagos das linhagens A/J e B10.A (Figura 32). Houve produção estatisticamente significativa de IL-6 em ambas as culturas de macrófagos de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A. No entanto, os níveis de IL-6 foram maiores para a linhagem suscetível A/J quando comparada a linhagem B10.A. Não houve produção de IL-6 nas culturas de camundongos B10.A não tratadas com IFN γ . O tratamento com curdlan na presença de IFN- γ induziu uma maior produção de IL-6 quando comparadas às culturas tratadas com curdlan, mas sem IFN γ dos camundongos A/J. Entretanto os camundongos A/J produziram elevados níveis de IL-6 mesmo na ausência de IFN γ . As culturas de macrófagos de camundongos A/J infectadas com o fungo e tratadas com curdlan, na presença ou ausência de IFN- γ , produziram concentrações similares de IL-6 quando comparadas às culturas de macrófagos não infectadas com o fungo e nas mesmas condições de tratamento. Para a linhagem B10.A os níveis de IL-6 também foram similares para as culturas que não foram infectadas com o fungo, mas foram tratadas com curdlan, na presença de IFN- γ , quando comparadas as culturas infectadas e tratadas com curdlan e IFN- γ . Foi observado um efeito dose-resposta para as concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL de curdlan para a linhagem A/J. Para a linhagem B10.A também houve efeito dose-resposta para as concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL de curdlan, no entanto ocorreu apenas nas culturas tratadas com IFN- γ . Não observamos diferença estatisticamente significativa na produção de IL-6 na concentração de 0,025 mg curdlan /mL utilizada.

Figura 32. Influência de curdlan na síntese de IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com curdlan nas concentrações de 0,4, 0,1 e 0,025 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-6 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Experimento repetido 2 vezes.

3.20.2 Efeito do Curdlan na produção de TNF- α

Avaliação do efeito do curdlan na produção de TNF- α obtida dos sobrenadantes de cultura de macrófagos das linhagens A/J e B10.A (Figura 33). Houve produção significativa de TNF- α nas culturas de macrófagos de camundongos resistentes A/J tratados ou não tratados com IFN γ . Não houve produção de TNF- α nas culturas de macrófagos B10.A não tratadas com

IFN γ . O tratamento com curdlan induziu aumento significativo de TNF- α nas culturas de A/J nas concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL, porém os valores foram mais expressivos nas culturas tratadas com IFN- γ . Curdlan induziu aumento na produção de TNF- α em macrófagos B10.A apenas na presença de IFN- γ . Houve produção similar de TNF- α tanto nas culturas infectadas quanto nas não infectadas pelo *P. brasiliensis* e tratadas com curdlan. Foi observado um efeito dose-resposta para as concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL de curdlan utilizadas nas culturas de macrófagos das linhagem A/J e B10.A infectados ou não com o fungo e somente na presença de IFN- γ para a linhagem B10.A. Não observamos diferença estatisticamente significativa na produção TNF- α de na concentração de 0,025 mg curdlan /mL utilizada.

a) sem IFN- γ

b) com IFN- γ

Figura 33. Influência de curdlan na síntese de TNF- α por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com curdlan nas concentrações de 0,4, 0,1 e 0,025 mg/mL e infectadas ou não com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 50 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de TNF- α foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001).). Experimento repetido 2 vezes.

3.20.3 Efeito do Curdlan na produção de IL-10

O tratamento com curdlan induziu aumento na produção de IL-10 em macrófagos A/J e B10.A somente na presença de IFN- γ . Houve aumento na produção de IL-10 nas concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL de curdlan utilizadas nas culturas macrófagos A/J que foram infectados com o fungo e tratados com IFN- γ , e apenas na concentração de 0,4 mg/mL para a linhagem B10.A nas mesmas condições de tratamento. Não observamos diferença estatisticamente significativa na produção de IL-10 na concentração de 0,025 mg curdlan /mL utilizada (Figura 34).

Figura 34. Influência de curdlan na síntese de IL-10 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com curdlan nas concentrações de 0,4, 0,1 e 0,025 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-6 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (** $P < 0,01$). Experimento repetido 2 vezes.

3.20.4 Efeito do Curdlan na produção de TGF- β

O tratamento por curdlan induziu elevada produção de TGF- β em macrófagos A/J após estímulo por IFN γ . Foi observado um efeito dose-resposta nas concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL de curdlan utilizadas em macrófagos A/J não infectados pelo fungo, e houve aumento de TGF- β apenas na concentração de 0,4mg/mL em macrófagos A/J, infectados com o fungo e estimulados por IFN γ . Não houve produção significativa de TGF- β nas culturas de macrófagos B10.A em nenhuma condição de tratamento (Figura 35).

Figura 35. Influência de curdlan na síntese de TGF- β por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com curdlan nas concentrações de 0,4, 0,1 e 0,025 mg/mL e infectadas ou não com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-6 foi avaliada no sobrenadante do cultivo.). Experimento repetido 2 vezes.

4 DISCUSSÃO

4.1 Influência do receptor de manose na interação de macrófagos com *P. brasiliensis*

No estudo do efeito da manana derivada de *Saccharomyces cerevisiae* na interação entre macrófagos de camundongos A/J e B10.A e o *P. brasiliensis*, observamos que os MR estão envolvidos nos processos de reconhecimento, ativação, aumento da atividade fungicida, fagocitose, além de produção de citocinas e NO. Foi observado também um efeito de ativação mais proeminente para camundongos da linhagem B10.A. No ensaio de atividade fungicida realizado através da determinação de unidades formadoras de colônias (UFC), foi observado que a adição de manana nas culturas de macrófagos de camundongos A/J e B10.A, previamente tratados com IFN- γ , induziu uma menor recuperação de fungos viáveis quando comparadas às culturas não tratadas com manana. Resultados mais marcantes foram observados com macrófagos B10.A que foram inibidos com duas concentrações diferentes de manana. A determinação da atividade fungicida deixou mais clara esta observação. A porcentagem da atividade fungicida, que é inversamente proporcional à quantidade de fungos viáveis recuperados no ensaio de UFC, também foi maior para os macrófagos de camundongos B10.A e foi ainda mais expressiva nas culturas que foram tratadas com manana.

A maior habilidade fungicida dos macrófagos B10.A pode estar correlacionada com a produção de NO, visto que macrófagos destes camundongos produziram maiores quantidades de NO quando comparados aos A/J. Este resultado, entretanto, não exclui a ação de outros mecanismos fungicidas tais como a produção de ROI (intermediários reativos do oxigênio), proteínas catiônicas ou depleção do triptofano pela indolamina 2,3 dioxigenase (ZELANTE et al., 2009). Pudemos observar também que nas culturas de macrófagos que foram tratadas com manana e IFN- γ , mas não foram posteriormente infectadas, houve produção significativa de NO; no entanto, foi menos expressiva que aquelas das culturas tratadas com manana e IFN- γ e que foram infectadas. Assim, pode-se sugerir que o *P. brasiliensis* é capaz de ligar-se aos receptores de manose dos macrófagos através de seus resíduos de manose levando à produção de NO. Há vários trabalhos que demonstram que o NO é molécula essencial e importante para a atividade fungicida de macrófagos de camundongos (BRUMMER, 1994; CANO et al., 1998; GONZALEZ, et al., 2000; BOGDAN, 2001).

No ensaio de fagocitose, observamos que as culturas de macrófagos de camundongos B10.A que não foram tratadas com manana, tanto na presença como na ausência de IFN- γ ,

apresentaram maiores índices de fagocitose, caracterizados pelo maior número de fungos ingeridos e/ou aderidos aos macrófagos. De modo interessante, a manana inibiu a fagocitose somente de células de camundongos B10.A, tanto na presença quanto na ausência de IFN- γ . Esta redução foi estatisticamente significativa apenas nas concentrações de 2,5 e 0,5 mg/mL de manana utilizadas. Não houve diferença estatisticamente significativa no índice de fagocitose nas culturas de macrófagos de camundongos A/J após o tratamento com manana, e nem mesmo na presença de IFN- γ , quando comparado às culturas não tratadas com manana. Podemos sugerir então que a manana exerceu um bloqueio competitivo com o fungo pelos sítios de ligação de manose presentes nos receptores de manose (MR) dos macrófagos dos camundongos B10.A, que resultou na inibição da fagocitose. Estes resultados devem ser interpretados em conjunto com os resultados de UFC, onde houve a menor recuperação de fungos viáveis dos macrófagos de camundongos B10.A ativados ou não pelo IFN- γ , e observou-se ainda eficiente atividade fungicida e produção de altos níveis de NO. Em virtude disto, nós podemos sugerir que a ligação dos carboidratos da manana aos seus sítios de ligação nos MRs da superfície dos macrófagos, induziu a sua ativação; estes, por sua vez, produziram citocinas e mediadores, que induziram maior atividade fungicida dos macrófagos. Deve-se também ponderar que a diminuição da interação/fagocitose de fungos induzida pela adição de manose possa ser a responsável pela menor carga fungica recuperada nos ensaios de atividade microbicida. Apesar de esta possibilidade existir, o perfil pró-inflamatório desencadeado pela manana (aumento de NO, IL-12 e redução de IL-10) em macrófagos B10.A falam a favor de efeito ativador da manana sobre estas células. Nossos achados sugerem que tanto macrófagos de camundongos A/J como B10.A utilizam receptores de manose para interagir com o *P. brasiliensis*, porém este mecanismo é mais importante para camundongos B10.A. Devemos ainda lembrar que estes achados estão de acordo com o fenótipo de macrófagos alveolares dos camundongos suscetíveis B10.A previamente caracterizado: eficiente habilidade fungicida pela alta produção de NO e síntese de um padrão pró-inflamatório de citocinas, com produção proeminente de IL-12 (PINA et al., 2008).

Ao avaliarmos a produção de citocinas, observamos que os macrófagos de camundongos B10.A tratados com manana produziram níveis elevados de IL-12 e ausência de IL-10. Isto indica um padrão de ativação pró-inflamatório que regularmente está associado com a eficiente morte de patógenos intracelulares, via produção de radicais de oxigênio ou nitrogênio; a IL-12 também pode estimular células NK a produzir elevadas quantidades de IFN- γ que irão induzir espécies reativas de oxigênio e outros mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos, os quais desenvolvem uma eficiente habilidade fungicida (TANAKA et al.,

2011). Os camundongos A/J, no entanto, apresentaram elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) associados à ausência de IL-12 após o tratamento com manana. Isto indica que devido à alta produção de IL-10 e TGF- β associada à produção de IL-6 e TNF- α possa ter ocorrido um balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de ativação do macrófago da linhagem A/J. Estas observações podem explicar as respostas mais proeminentes de ativação ocorrida com os macrófagos de camundongos B10.A tratados com manana, os quais apresentaram um padrão de ativação com predomínio pró- inflamatório. Em conjunto, nossos dados obtidos com a utilização de manana solúvel sugerem que tanto camundongos B10.A como A/J utilizam os MRs para reconhecer e interagir com o fungo. Entretanto, como o padrão de ativação foi diferente entre as duas linhagens, em especial a produção de citocinas, pode-se inferir que os MRs não são os únicos receptores envolvidos e que linhagens diversas de hospedeiros utilizam com graus diversos de importância outros receptores de imunidade inata.

Para continuarmos na avaliação da importância dos receptores de manose (MR) as culturas foram tratadas com anticorpos anti-MR, os quais funcionaram como antagonistas do *P. brasiliensis* pela ocupação dos sítios ligantes de manana presentes nos receptores de manose (MR) da superfície dos macrófagos. Os resultados obtidos mostraram que houve bloqueio nos processos de adesão e fagocitose, atividade fungicida e produção de NO em macrófagos de ambas as linhagens de camundongos. Observamos que o bloqueio com anticorpo anti-MR nas culturas de macrófagos de camundongos A/J e B10.A, previamente tratados com IFN- γ , induziu maior recuperação de fungos viáveis quando comparado às culturas não tratadas com anti-MR. Um maior efeito sobre a recuperação de fungos, isto é, maior inibição da atividade fungicida, foi encontrado em camundongos resistentes. A produção de NO também foi menor após o bloqueio com anti-MR em ambas as linhagens. No ensaio de fagocitose, encontramos uma diminuição no número de fungos aderidos e /ou ingeridos na presença de IFN- γ em ambas as linhagens após o bloqueio com anti-MR. O tratamento com anticorpos anti-MR levou a inibição da produção das citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. Os macrófagos de camundongos B10.A tratados com anti-MR produziram baixas concentrações de IL-12 e não houve produção de IL-6 e TNF- α . Além disso, houve baixa produção da citocina antiinflamatória IL-10 e das inflamatórias TNF- α e IL-6 pelos macrófagos de camundongos A/J. Observamos, entretanto, aumento da produção de TGF- β após o bloqueio dos MRs dos camundongos resistentes e isso teria contribuído para a baixa atividade fungicida observada. Este quadro leva a crer que os MRs influenciaram a síntese de citocinas características de ambas as linhagens. Em conjunto, os nossos resultados

sugerem mais uma vez que os MRs têm função importante em ambas às linhagens de camundongos, mas devem agir em conjunto com PRRs distintos em cada uma dessas linhagens. É interessante que tanto com o uso de agonistas (manana) como antagonistas (anti-MR) observam-se perfis de ativação distintos. Em macrófagos B10.A há o predomínio de síntese de IL-12 e NO e atividade fungicida marcante. Em camundongos A/J, IL-10, TGF- β , TNF- α e IL-6 são as principais citocinas produzidas indicando vias de sinalizações diferentes, que levam a padrões distintos de ativação gênica. Tais resultados merecem novas abordagens de estudo para revelar a real importância dos vários PRR na resposta imune inata de camundongos B10.A e A/J. Outro dado importante por nós observado é que tanto a manana (sem Pb) e o Pb (sem manana) desempenham papel equivalente na ativação de macrófagos. Isso reforça o importante papel deste receptor na PCM de camundongos suscetíveis e resistentes. Como apresentado na introdução, os receptores de manose desempenham importante papel na resposta imune contra vários fungos. Assim, a expressão destes receptores em monócitos/macrófagos de camundongos leva à síntese de TNF- α e IL-1 β após interação com resíduos de manose presentes na parede de *C. albicans*. O mesmo perfil ocorre quando se estuda o comportamento de células dendríticas. Em ambos os modelos, entretanto, a via de sinalização celular desencadeada pela ocupação deste receptor é desconhecida (NETEA et al., 2008).

A literatura demonstra que os MRs reconhecem resíduos de manose N-ligados enquanto que o TLR4 reconhece resíduos de manose O-ligados (além de LPS, seu agonista tradicional) (NETEA et al., 2008). Os receptores CR3 (CD11b/CD18) possuem um domínio de lectina que reconhece certos monossacárides e uma variedade de β -glucanas, além do reconhecimento de alta afinidade com polímeros de manose (BROWN e GORDON, 2003). Para avaliarmos a função dos receptores TLR-4 e CR3 (CD11b/CD18) as culturas de macrófagos foram tratadas com anticorpos anti-TLR4 e anti-CD11b, que promoveram o bloqueio de interação com o *P. brasiliensis* pela ocupação dos sítios ligantes dos receptores TLR-4 e CR3. Assim como os anticorpos anti-MR, os anticorpos anti-TLR4 e anti-CD11b funcionam como antagonistas da interação do *P. brasiliensis* com macrófagos de ambas as linhagens. Ao estudarmos o efeito do bloqueio dos receptores TLR4 e CR3 com anticorpos anti-TLR4 e anti-CD11b na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis* obtivemos diminuição da carga fúngica em ambas as linhagens, porém foi mais marcante para a linhagem A/J. De modo interessante, a menor recuperação de fungos obtida no ensaio fungicida não pôde ser correlacionada com o aumento da produção de NO, podemos então sugerir que o bloqueio dos receptores TLR4 e CR3 reduziu a capacidade

de ligação do fungo a estes receptores, inibindo por sua vez a fagocitose e/ou aderência do fungo, como foi observado no ensaio de fagocitose, este resultado ocorreu com ambas as linhagens, porém foi mais expressivo para a linhagem A/J. Obtivemos menor adesão e/ou ingestão de fungos pelos macrófagos de camundongos A/J quando comparados aos macrófagos B10.A, mesmo na ausência de bloqueio, confirmando a maior capacidade fagocítica dos macrófagos de camundongos B10.A. O bloqueio com anti-TLR4 e anti-CD11b não inibiu a produção de NO em ambas as linhagens sugerindo que a utilização de TLR4 e CR3 pelos macrófagos A/J e B10.A tem importância menos relevante na indução da iNOS. Entretanto, o bloqueio com os anticorpos anti-TLR4, anti-CD11b bem como com anti-MR levou à inibição da fagocitose do *P. brasiliensis*. Estes dados, associados aos descritos na literatura (TADA et al., 2002, NETEA et al., 2006), sugerem que os MRs, TLR4 e CR3 possam estar envolvidos no reconhecimento de estruturas de manose presentes na parede do fungo. Como TLR4 e CR3 parecem ser mais importantes para camundongos A/J, poderíamos sugerir que os macrófagos desses camundongos reconhecem preferencialmente manose O-ligada, enquanto que macrófagos de camundongos B10.A reconhecem preferencialmente resíduos de manose N-ligados. É ainda possível que haja uma sinergia entre estes receptores nos mecanismos de reconhecimento dos componentes polissacarídeos do fungo. A ocupação do TLR4 por seus agonistas (principalmente o LPS) leva à mobilização de moléculas adaptadoras como MyD88 e a subsequente produção do fator de transcrição NF- κ B, que irão induzir a síntese preferencial de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12 e TNF- α . Este padrão de ativação predispõe à ativação predominante de respostas tipo 1, pró-inflamatórias (ZUGHAIER et al., 2005). O bloqueio de ambos, TLR4 e CR3 levam à diminuição da produção de IL-12 e aumento de IL-10 por macrófagos B10.A. Parece então que estes receptores estão envolvidos na ativação pró-inflamatória destes macrófagos que deve envolver a mobilização da proteína adaptadora MYD88 e a ativação do fator de transcrição NF κ B. Realmente, em nosso laboratório, houve a demonstração em trabalhos anteriores, que tanto o TLR4 como a proteína MYD88 exercem função importante na PCM pulmonar (LOURES et al., 2011). Com macrófagos A/J, verificamos que tanto o bloqueio do TLR4 como do CR3 levam à síntese aumentada de IL-6 e redução dos níveis de TNF- α e IL-10. Assim, ambos os receptores parecem desempenhar uma atividade equivalente em camundongos resistentes e suscetíveis. Entretanto, somente a inibição de CR3 levam maior síntese de TGF- β , o que propiciaria um padrão anti-inflamatório mais marcante.

De maneira importante, verificamos que tanto os MR como TLR4 e CD11b exercem função crucial mas de importância diversa na interação de macrófagos de camundongos

resistentes e suscetíveis ao *P. brasiliensis*. Tada et al. (2002), estudaram o envolvimento dos TLR4 e CD14 de membrana (mCD14) no reconhecimento de manana derivada de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Candida albicans*. Para isso eles realizaram o pré tratamento de monócitos humanos em cultura com anticorpos anti-TLR4 e anti-CD14 e posteriormente as culturas foram estimuladas com manana derivada *S. cerevisiae* e com *C. albicans*. Foi observado diminuição da produção da citocina TNF- α após o bloqueio com os anticorpos quando comparados a altos níveis produzidos nas culturas sem tratamento com anti-TLR4 e anti-CD14. Assim, o bloqueio do TLR4 impede o desencadeamento de atividades pró-inflamatórias dos monócitos, fato equivalente por nós aqui observado.

O reconhecimento de resíduos de manose, fucose e N-acetilglucosamina de componentes de *C. albicans* por receptores MRs e TLR4 também foi observado no trabalho de Netea et al. (2006). Foram testados macrófagos de camundongos WT e nocautes de TLR4 (TLR4^{-/-}) tratados com anticorpo anti-MR; este anticorpo promoveu a total inibição da produção de citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ nas culturas. Nossos resultados são inovadores, pois demonstram que o efeito do bloqueio de um mesmo receptor por certo agonista leva a resultados distintos de ativação dependendo da linhagem genética do animal utilizado. Este fato abre novas perspectivas para o entendimento da função destes receptores na imunoproteção contra patógenos e no desencadeamento das respostas imunes inata e adaptativa.

Nós também realizamos a caracterização fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo através da expressão dos marcadores de membrana F4/80, CD11b, CD11c, CD86, CD40, IA^k, MR, TLR4, DC-SIGN, TLR2 e Dectina-1 dos macrófagos de camundongos A/J e B10.A, tratados ou não-tratados com manana e infectados ou não-infectados com Pb, e ativados ou não ativados por IFN- γ . A análise dos marcadores de membrana de macrófagos de camundongos B10.A e A/J revelou padrões interessantes que distinguem estas linhagens. Assim, pudemos verificar que macrófagos B10.A apresentam maior expressão de F4/80, das cadeias α de integrinas CD11b e CD11c; e CD40, parecem também expressar maior número de moléculas TLR2, TLR4 e DC-SIGN. De maneira geral, pode-se dizer que tanto o tratamento com manana como com *P. brasiliensis* levou à menor expressão destes marcadores, porém o tratamento com manana induziu diminuição mais marcante destes marcadores quando comparado às culturas infectadas com Pb. Pudemos observar que o tratamento com manana levou a diminuição da expressão de MR, TLR2, F4/80, CD11c, CD40 e CD86 em macrófagos de camundongos A/J. Enquanto que em macrófagos de camundongos B10.A o tratamento com manana levou a diminuição da

expressão de TLR2, dectina-1, CD11b, CD11c, F4/80 e CD40. Os macrófagos infectados com Pb de camundongos A/J mostraram reduzida expressão de TLR2 e CD86, e curiosamente houve aumento da expressão de CD40 e de dectina-1 após infecção pelo Pb. Nos macrófagos de camundongos B10.A infectados com o fungo houve menor expressão de TLR4, TLR2, CD11b, Cd11c, dectina-1, IA^k e CD40. Observamos que o tratamento com manana não interferiu na expressão de TLR4 e DC-SIGN em macrófagos de ambas as linhagens. Estes resultados demonstram que a interação de manana ou *P. brasiliensis* com macrófagos de camundongos B10.A e A/J deve levar à interiorização destes receptores de macrófagos, provavelmente devido ao envolvimento dos mesmos no processo de fagocitose. A menor expressão de moléculas de membrana, talvez seja somente temporária e as células talvez venham a expressar novamente os receptores em níveis equivalentes ou maiores do que observado antes do tratamento. Além disso, podemos observar um padrão distinto de ativação celular entre macrófagos de ambas as linhagens de camundongos A/J e B10.A, demonstrado pelas diferenças nas expressões destes marcadores de membrana, bem como diferenças na redução da expressão destes marcadores entre estas células após o tratamento com a manana e também após infecção com o *P. brasiliensis*. A alteração das moléculas de ativação e co-estimulatórias devem alterar o padrão de apresentação de antígenos para as células T, assim como a migração das células inflamatórias para os tecidos infectados. Trabalho similar realizado por Bonfim et al. (2009), utilizando zymozan para o tratamento de monócitos e neutrófilos humanos, e infecção dos mesmos com as cepas Pb18 (altamente virulenta de *P. brasiliensis*) e Pb265 (de baixa virulência), demonstrou a diminuição da expressão de TLR1, TLR2, TLR4 e dectina-1 na superfície principalmente de monócitos, e esta diminuição foi similar à causada pelo estímulo com zymozan, indicando que os complexos de ligação são rapidamente internalizados. No entanto, ao avaliarem a expressão de RNAm, observaram um aumento de RNAm para TLR-2 e RNAm para dectina-1 em resposta a ambas as cepas, principalmente em resposta à cepa de baixa virulência Pb265. Estes achados mostraram que o reconhecimento preferencial de zymozan e da cepa Pb265 de baixa virulência por TLR2 e dectina-1 resultou num processo de ativação caracterizado pela produção balanceada de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

4.2 Influência do receptor de β -glucana, dectina-1, na interação de macrófagos com *P. brasiliensis*

Os receptores dectina-1 que reconhecem β -1-3 glucanas atuam como potentes indutores de citocinas pró-inflamatórias e de recrutamento de células em resposta a diversos patógenos, principalmente os fungos além de partículas estimuladoras como zymosan, laminarina e curdlan (TADA et al., 2002; TAYLOR et al., 2007; ROSAS et al., 2008; HERNANZ-FALCÓN et al., 2009). Estudos sugerem que diferentes tipos de partículas de β -glucanas variam na sua habilidade de induzir respostas inatas dependentes de dectina-1 (ROSAS et al., 2008, TSONI e BROWN, 2008). Curdlan, uma partícula grande altamente purificada composta de β -1-3 glucana de aproximadamente 0,2 μ m de diâmetro derivada de *Alcaligenes faecalis* difere das micropartículas purificadas compostas de manana, e de β -1-3 glucana derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (~ 3 μ m) de diâmetro e das partículas de laminarina, pequenas e de baixo peso molecular compostas de β -1-3, 1-6 glucanas derivada de *Laminaria digitata* (< 10,000 MW). Da mesma forma, partículas grandes e de alto peso molecular como o zymosan derivadas da parede celular total de *Saccharomyces cerevisiae* compostas por β -1-3 glucanas e β -1-6 glucanas e também por α -mananas e manoproteínas diferem de curdlan. Apesar de curdlan ser um potente indutor de citocinas pró-inflamatórias e de produtos do metabolismo oxidativo liberados nas respostas inflamatórias que induzem a progressão da fagocitose, curdlan, por seu grande tamanho parece “frustrar a fagocitose” resultando desta forma em um dramático aumento da resposta inflamatória pela produção de citocinas (ROSAS, 2008; YOSHITOMI et al., 2008; HERNANZ-FALCÓN et al., 2009). Há também a possibilidade de que dectina-1 possa ainda sinalizar dentro do endossoma para uma resposta alternativa como a produção de espécies reativas do oxigênio (GANTNER et al., 2005, UNDERHILL et al., 2005, HERNANZ-FALCÓN et al., 2009). As partículas de zymosan, ao contrário do curdlan, parecem estimular a fagocitose, como foi observado no estudo de Diniz et al., (2004). Estes autores utilizaram macrófagos peritoneais de camundongos pentraxina-3 (PTX3) transgênicos - que expressam altos níveis de RNAm de PTX3 - estimulados com zymosan, e observaram aumento dos índices de fagocitose. Ainda neste mesmo trabalho, os macrófagos PTX3 transgênicos tratados com zymozan, foram infectados com *P. brasiliensis* onde houve aumento ainda mais expressivo dos índices de fagocitose. Diferenças na quantidade e estrutura de β -glucanas e α -glucanas, além de resíduos de manose, manana e manoproteínas que compõem a parede externa dos fungos também irão influenciar nestas respostas. Estas diferenças associadas com a habilidade de outros fungos,

como exemplo o *P. brasiliensis*, de modificar o componente β -glucana na sua parede celular durante a infecção, é sugestivo de que estes fungos possam mascarar a β -glucana da sua parede celular e evitar o reconhecimento imune através de dectina-1 (BROWN, et al., 2003).

Para avaliarmos os receptores de β -glucana, dectina-1, as culturas de macrófagos foram tratadas com laminarina - polímeros de glucose ramificados de baixo peso molecular derivados de *Laminaria digitata* compostas de β -1-3, 1-6 glucanas. Utilizamos também outro agonista de dectina-1, o curdlan - uma β -glucana composta de partículas de carboidratos grandes e de ligações lineares de alto peso molecular derivada de *Alcaligenes faecalis*.

Ao avaliarmos o efeito do tratamento com laminarina na atividade fungicida de macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*, observamos efeitos opostos. A laminarina diminuiu a capacidade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes (A/J), tanto para as culturas tratadas com IFN- γ como para as não tratadas, enquanto que para os camundongos B10.A, ao contrário, houve aumento da capacidade fungicida após o tratamento com laminarina na ausência de IFN- γ . A produção de NO foi elevada para ambas as linhagens tratadas com IFN- γ , então a morte do fungo não foi proporcional à síntese desse composto. No ensaio de fagocitose, houve maior número de fungos aderidos e/ou ingeridos pelos macrófagos de camundongos B10.A tratados com laminarina. Em contraste, o número de adesão e/ou ingestão dos fungos pelos macrófagos dos camundongos A/J tratados com laminarina diminuiu expressivamente. O tratamento com laminarina e consequente bloqueio dos receptores de β -glucanas dectina-1 presentes na superfície dos macrófagos de camundongos resistentes A/J levou à inibição das células; no entanto, parece não ter ocorrido o mesmo com os camundongos suscetíveis B10.A, onde a laminarina parece ter ativado os macrófagos ao interagir com receptores dectina-1. Em ambas as linhagens houve aumento de NO e, portanto a morte do fungo não foi proporcional ao nível de NO produzido. Ao avaliarmos a produção de citocinas após o tratamento com laminarina, observamos que os camundongos da linhagem A/J produziram elevados níveis de IL-6, TNF- α e TGF- β , porém reduzidos de IL-10. Similarmente, os macrófagos de camundongos B10.A tratados com laminarina, produziram maiores níveis de IL-6 e IL-12 e diminuição de IL-10, indicando um padrão de ativação pró- inflamatório, que regularmente está associado com a eficiente morte de patógenos intracelulares via produção de radicais de oxigênio ou nitrogênio (NATHAN e SHILOH, 2000). Nos camundongos A/J, apesar da síntese alta de TNF- α , IL-6 e NO, houve diminuição da atividade fagocítica e fungicida induzida pela laminarina e isso poderia ser atribuído à síntese aumentada de TGF- β , fato que não ocorreu com a linhagem B10.A. Os camundongos A/J possuem então, maior habilidade para secretar TNF- α e IL-6

quando comparados aos camundongos B10.A e isto pode estar associado à sua melhor atividade de APCs. Então, apesar da ineficiente atividade fungicida, macrófagos de camundongos A/J, têm a possibilidade de desenvolver posteriormente uma resposta adaptativa balanceada do tipo Th1/Th2 T CD4⁺ e de células TCD8⁺ do tipo-1 secretora de IFN- γ , como observado em trabalhos anteriores (CANO et al., 1995; CALICH e BLOTTA, 2004; CHIARELLA et al., 2007; ARRUDA et al., 2007). Ao analisarmos o padrão da outra citocina anti-inflamatória IL-10, observamos que a laminarina induziu baixa produção desta citocina pelos macrófagos de ambas as linhagens de camundongos. Estudos sobre a interação de macrófagos e DCs com *C. albicans* revelaram que a interação de dectina-1 com β -glucanas do fungo levava à síntese preferencial de IL-10 e IL-12 por via de sinalização que utiliza a quinase Syk e a proteína adaptadora CARD-9. Este processo de sinalização induz fatores de transcrição NF- κ B e NF-AT associados à síntese preferencial de IL-10. Quando células dendríticas, entretanto, são ativadas por β -glucanas através do receptor dectina-1 a mobilização de Syk e CARD-9 leva à síntese preferencial de IL-23 e IL-6 induzindo a diferenciação preferencial de células T-naive para um padrão Th17 (NETEA et al., 2008). Em nosso trabalho, os macrófagos A/J ativados por laminarina sintetizaram altos níveis de TNF- α , IL-6 e TGF- β o que poderia também levar à polarização Th17 no início da resposta imune adaptativa desta linhagem. Em camundongos B10.A a síntese de IL-12 levaria a um padrão pró-inflamatório distinto, mais associado à diferenciação Th1. Em resumo, nossos dados obtidos através do tratamento dos macrófagos de camundongos A/J e B10.A com laminarina mostraram que houve bloqueio das atividades fagocítica e fungicida dos macrófagos de camundongos A/J. O oposto ocorreu aos macrófagos de camundongos B10.A após tratamento com laminarina, onde observamos ativação dos macrófagos. O perfil de citocinas anti-inflamatórias TGF- β produzidas pelos macrófagos A/J, sugerem que a elevada produção de TGF- β , pode ter contribuído para a diminuição da atividade fungicida destes camundongos. Já para os camundongos B10.A, a diminuição da produção de IL-10 não influenciaram na capacidade fungicida destes camundongos. A capacidade de ativação de macrófagos e produção de citocinas induzida pela laminarina observado em nosso trabalho, estão de acordo com os estudos de Yoshitomi et al., (2008) que demonstraram que a laminarina e curdlan induziram a maturação de células dendríticas da medula óssea (BM-DCs) de camundongos, além da produção de citocina TNF- α por estas células maduras. Em outro trabalho, Ferwerda et al., (2008), utilizaram curdlan na ativação de monócitos e macrófagos humanos resultando na produção de citocina TNF- α ; os autores também mostraram que esta ativação era mediada por dectina-1 em sinergia com TLR2 e TLR4. Como não observamos correlação entre níveis

de NO e atividade fungicida, seria interessante analisarmos a produção de ROI e outros mecanismos microbicidas em nosso modelo após o bloqueio dos receptores de dectina-1 por laminarina e curdlan.

Ainda para avaliarmos os receptores de β -glucanas, os macrófagos foram tratados com curdlan - partículas de carboidratos grandes e de ligações lineares de alto peso molecular derivada de *Alcaligenes faecalis*. Observamos um aumento da capacidade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) tratados com curdlan, tanto para os macrófagos tratados com IFN- γ como com aqueles não tratados. De maneira interessante, o tratamento com curdlan diminuiu a capacidade fungicida dos macrófagos de camundongos suscetíveis (B10.A) na presença de IFN- γ ; no entanto, não houve diminuição da capacidade fungicida nas culturas de camundongos B10.A na ausência de IFN- γ . Estes resultados são opostos àqueles obtidos com a laminarina [β -(1,3) (1,6) glucanas]. Estes dados são muito interessantes e ainda não estão descritos na literatura, um mesmo receptor levando a atividades biológicas opostas. No ensaio de fagocitose, houve diminuição do número de fungos aderidos e/ou ingeridos pelos macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Com camundongos suscetíveis, entretanto, só foi verificado com macrófagos tratados com IFN- γ . Assim, a grande partícula de curdlan parece inibir a fagocitose em ambas as linhagens. Com relação à atividade secretora dos macrófagos, curdlan levou a um aumento da síntese de NO e citocinas por ambas as linhagens. Ambas as linhagens secretaram níveis mais altos de TNF- α , IL-6 e IL-10 nas culturas de macrófagos tratados com curdlan. Ainda houve produção aumentada de TGF- β nas culturas de macrófagos A/J estimuladas por IFN- γ . Não houve, entretanto, produção significativa de TGF- β nas culturas de macrófagos B10.A. A produção mais elevada de NO em ambas as linhagens não explicam a atividade fungicida distinta induzida pelo curdlan e outros processos devem estar associados a esta função.

Podemos sugerir que a produção de IL-10 e não de TGF- β pelos macrófagos B10.A após o tratamento por curdlan possa ter contribuído para o aumento da carga fúngica encontrado no ensaio de CFU. Ainda, esta citocina anti-inflamatória explicaria a diminuição da capacidade fagocítica de macrófagos B10.A causada por curdlan, e a diminuição da sua atividade fungicida. Já para os macrófagos de A/J, a menor carga fúngica obtida no ensaio de CFU, parece não estar relacionada com a atividade fungicida, mas poderia estar relacionada com a inibição da fagocitose pelos macrófagos, decorrente do tratamento com curdlan, o qual levou ao bloqueio do receptor dectina-1, dificultando a adesão e/ou ingestão do fungo pelos

macrófagos. A produção de TGF- β também pode ter contribuído para a inibição da fagocitose pelos macrófagos de A/J.

Mediante os resultados obtidos, e de acordo com a literatura (ROSAS, 2008; YOSHITOMI et al., 2008; HERNANZ-FALCÓN et al., 2009), podemos sugerir que curdlan tem a capacidade de ativar os macrófagos, e ao mesmo tempo de inibir o processo de fagocitose pelo bloqueio dos receptores de β -glucanas. Além disso, curdlan parece atuar de modo diferente nos receptores de β -glucanas dos macrófagos de camundongos A/J e B10.A. Podemos também sugerir que os receptores dectina-1 de macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis também apresentam afinidades e especificidades diferentes pelas diferentes partículas de β -glucanas. Além disso, mecanismos diferentes de sinalização intracelular entre macrófagos de camundongos A/J e B10.A podem estar envolvidos no reconhecimento de diferentes partículas de β -glucanas. Outra hipótese a ser levantada é que os macrófagos de camundongos B10.A possuam receptores mais específicos e de maior afinidade para os componentes β 1-6 glucanas presentes na laminarina. Em contrapartida, é possível que os macrófagos de camundongos A/J possuam receptores de maior afinidade e especificidade para β -1-3 glucanas presentes em curdlan. Estudos realizados através da caracterização bioquímica detalhada da afinidade da interação do receptor dectina-1 para β -1-3 as glucanas mostram que a especificidade de dectina-1 pode ser extremamente alta, e é influenciada pelo grau de ramificações e comprimento das cadeias dos polímeros de β -1-3 as glucanas. Foi observado também que dectina-1 não reconhece outras ligações de monômeros ou cadeias curtas de oligossacarídeos β (1-3)-ligados (KIMBERG e BROWN, 2008; ADAMS et al., 2008; PALMA et al., 2006; BROWN e GORDON, 2001). No entanto dectina-1 pode reconhecer mycobactéria, a qual não expressa β -glucanas, sugerindo que possam haver outros ligantes exógenos ainda não identificados para este receptor (YADAV e SCHOREY, 2006; ROTHFUCHS et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos com o uso de manana, laminarina e curdlan, além de anticorpos monoclonais anti-MR, anti-TLR4 e anti-CR3, demonstram a importância de PRRs que reconhecem manose e β -glucana no reconhecimento de *P. brasiliensis* pelos macrófagos de camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo. Os receptores MR, TLR4 e CR3 parecem estar envolvidos no reconhecimento dos polissacarídeos contendo manana, e participam dos processos de ativação dos macrófagos, como revelado pela alteração da atividade fungicida e fagocítica, e controle da produção de NO e citocinas. Os receptores que reconhecem manose parecem também modular a expressão de proteínas de membrana envolvidas na ativação de macrófagos.

O receptor de beta-glucana, dectina-1, por sua vez, também está fortemente envolvido nos processos de atividade fungicida, fagocitose, produção de NO e de citocinas pelos macrófagos de camundongos A/J e B10.A. No entanto, após o tratamento com laminarina e curdlan, verificamos diferenças no padrão de ativação dos macrófagos entre estas linhagens e o polímero de glucana utilizado. O tratamento com β -1-3, 1-6 glucanas da laminarina, e de curdlan parece atuar de maneira oposta sobre macrófagos das linhagens A/J e B10.A. A laminarina parece ativar macrófagos B10.A. e inibir macrófagos A/J. Curdlan, por sua vez, parece ativar macrófagos da linhagem A/J e inibir macrófagos da linhagem B10.A; este polissacarídeo de alto peso molecular, entretanto, inibe os processos de adesão e fagocitose do fungo por macrófagos de ambas as linhagens. A utilização de agonistas e antagonistas dos receptores MR, TLR4, CR3 e dectina-1 nos auxiliaram na caracterização do envolvimento destes receptores de reconhecimento de patógenos na interação entre macrófagos e células leveduriformes do *P. brasiliensis*. Estes processos iniciais de imunidade inata tem especial relevância, uma vez que exercem importante atividade reguladora da imunidade adquirida que se estabelece posteriormente.

REFERÊNCIAS¹

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; RIVINO, L.; GEGINAT, J.; JARROSSAY, D.; GATTORNO, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; NAPOLITANI, G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 639-649, 2007.

ADAMS, et.al. Differential high affinity interaction of Dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side chain branching. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 325, p. 115-123, 2008.

AGRAMONTE-HEVIA, J.; GONZALEZ-ARENAS, A.; BARRERA, D.; VELASCO-VELAZQUEZ, M. Gram-negative bacteria and phagocytic cell interaction mediated by complement receptor 3. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 255-266, 2002.

AKIRA, S.; UEMATSU, S. Toll-like receptors and innate immunity. **J. Mol. Med.**, v. 84, p. 712-725, 2006.

ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmuno-globulinemia in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 79, p. 115-123, 1982.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clinical Immunology**, v. 103, p. 185-195, 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; FRANCO, M. F.; CALICH, V. L. G. Dual role of IL-4 in pulmonary paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v.72, p. 3932-3940, 2004.

ARRUDA, C.; VAZ, C. A.; CALICH, V. L. 2007. Aseptic cure of pulmonary paracoccidioidomycosis can be achieved after a previous subcutaneous immunization of susceptible but not resistant mice. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 704-13, 2007.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BAIDA, H.; BISELLI, P. J. C.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.
- BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with janus green b. **Sabouradia**, v. 5, p. 26-29, 1966.
- BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 345-350, 2007.
- BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. 1988. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3056-3063, 1988
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001.
- BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; SOUZA, M. H.; BLOTTA, MHSL, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.**, v. 17, 1-12.
- BRAUN, M. C.; LAHEY, E.; KELSALL, B. L. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3009-3017, 2000.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. **Nature.**, v. 413, p. 36-37, 2001.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.
- BROWN, G. D.; TAYLOR, P. R.; REID, D. M. Dectin-1 is a major betaglucan receptor on macrophages. **J Exp Med.**, v. 296, p. 407-412, 2002.
- BROWN, G. D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D. L.; WILLMENT, J. A.; MARSHALL, A. S.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 1119-1124, 2003.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 471-479, 2005.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89, 1993.

BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In: FRANCO, M. ; SILVA LACAZ, C.; RESTREPO MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.), **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 213-223.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623. 1998.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.

CALICH, V. L. G.; BLOTTA, M. H. S. L.; HUFFNAGLE, G.; FIDEL, P. (Ed.). Paracoccidioidomycosis. **Fungal immunology**. New York, N.Y.: Kluwer, 2004. p. 112-124.

CALICH, V. L. G.; PINA, A.; FELONOTO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T. A.; LOURES, F. V. Toll-like receptors and fungal infection: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 53 p. 1-7, 2008.

CAMBI, A.; KOOPMAN, M.; FIGDOR, C. G. How C-type lectins detect pathogens. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 481-488, 2005.

CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. **Infect. Immun.**, v.60, p. 2096-2100, 1992.

CANO, L. E.; GÓMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. 1994. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infect. Immun.**, v.62, p. 1494-1496, 1994.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of

gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1771-1777, 1988.

CHIARELLA, A. P., ARRUDA, C., PINA, A., COSTA, T. A.; FERREIRA, R. C.; CALICH, V. L. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1078-1088, 2007.

COLMENARES, M.; CORBI, A. L.; TURCO, S. J.; RIVAS, L. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1186-1190, 2004.

CORRALIZA, M. I.; SOLER, G.; EICHMANN K.; MODOLELL, M. Arginase induction by supressors of nitic oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, v. 206, p. 667-673, 1995.

DENNEHY, K. M.; FERWERDA, G.; FARO-TRINDAD, I.; PYZ, E.; WILLMENT, J. A.; TAYLOR, P. R.; KERRIGAN, A.; TSONI, S. V.; GORDON, S.; MEYER-WENTRUP, F.; ADEMA, G. J.; KULLBERG, B. J.; SCHWEIGHOFFER, E. TYBULEWICZ V, MORA-MONTES HM, GOW NA, WILLIAMS DL, NETEA M. G.; BROWN, G. D. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 500-506, 2007.

DENNEHY, K. M.; BROW, G. D. The role of β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. **J. Leuk. Biol.**, v. 82, p. 253-258, 2007.

DILLON, S.; AGRAWAL, S.; BANERJEE, K.; LETTERIO, J.; DENNING, T. L.; OSWALD-RICHTER, K.; KASPROWICZ, D. J.; KELLAR, K.; PARE, J.; VAN DYKE T.; ZIEGLER, S.; UNUTMAZ, D.; PULENDRAN, B. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 916-928, 2006.

- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1998.
- DINIZ, S. N.; NOMIZO, R.; CISALPINO, P. S.; TEIXEIRA, M. M.; BROWN, G. D.; MANTOVANI, A.; GORDON, S.; REIS, L. F. L.; A.; DIAS A. M. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages **Journal of Leukocyte Biology.**, v. 75, p. 649-56, 2004.
- DOYLE, S. L., O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NFkB to new insights into transcriptional regulation in innate immunity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 1102-1113, 2006.
- FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp. São Paulo.**, v. 18, p. 197-254, 1955.
- FAZIOLI, R. A. **Paracoccidioidomicose experimental murina, estudo da proliferação e da contribuição de células TCD4⁺ e TCD8⁺ na resposta imune de camundongos resistentes e susceptíveis.** 1997. XX f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1997.
- FERWERDA, G.; MEYER-WENTRUP, F.; KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G.; ADEMA, G. J. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. **Cell Microbiol.**, v. 10, p. 2058–2066, 2008.
- FIGDOR, C. G.; VAN KOOYK, Y.; ADEMA, G. J. C-Type Lectin Receptors On Dendritic Cells And Langerhans Cells. **Nature Rev. Immunol.**, v. 2, p. 77–84, 2002.
- FRANCO, M.; PERACOLI, M. T.; SOARES, A.; MONTENEGRO, R.; MENDES, R. P.; MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 5, p. 115-149, 1993.
- FRANCO, M. Host parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5, 1987.
- GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **EMBO J.**, v. 24, p. 1277-1286, 2005.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2546-2552, 2000.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 23 – 35, 2003.

GOW, N. A.; NETEA, M. G.; MUNRO, C. A.; FERWERDA, G.; BATES, S.; MORA-MONTES, H. M.; WALKER, L.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; TSONI, V.; BROWN, G. D.; ODDS, F. C.; VAN DER MEER, J. W.; BROWN, A.J.; KULLBERG, B. J. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 1565-1571, 2007.

GROSS, O.; GEWIES, A.; FINGER, K.; SCHÄFER, M.; SPARWASSER, T.; PESCHEL, C.; FÖRSTER, I.; RULAND, J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442 p. 651-656, 2006.

HATANO, Y.; TANIUCHI, S.; MASUDA, M.; TSUJI, S.; ITO T.; HASUI, M.; KOBAYASHI, Y.; KANEKO, K. Phagocytosis of heat-killed staphylococcus aureus by eosinophils: comparison with neutrophils. **APMIS**, v. 117, p. 115-123, 2009.

HAWLISCH, H.; BELKAID, Y.; BAELDER, R.; HILDEMAN, D.; GERARD, C.; KÖHL, J. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. **Immunity**, v. 22, p. 415-26, 2005.

HERNANZ-FALCÓN, P.; JOFFRE, O.; WILLIAMS, D. L.; REIS E SOUSA C. Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, p. 507-513, 2009.

HERRE, J.; MARSHALL, S.; CARON, E.; EDWARDS, A. D.; WILLIAMS, D. L.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; REIS E SOUSA, C.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood**, v. 104, p. 4038-4045, 2004.

HIBBS, J. B.; VAVRIN, Z. JR.; TAINTOR, R. R. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol.**, v. 138, p. 550-565, 1987.

HIBBS, J.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. JR.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 157, p. 87-94, 1988.

KARP, C. L.; GRUPE, A.; SCHADT, E.; EWART, S. L.; KEANE-MOORE, M.; CUOMO, P. J.; KÖHL, J.; WAHL, L.; KUPERMAN, D.; GERMER, S.; AUD, D.; PELTZ, G.; WILLS-KARP, M. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 221-226, 2000.

KARHAWI, A. S. K.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 225-229, 1999.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L.M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, p. 173-178, 1985.

KIMBERG, M.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in antifungal immunity. **Med. Mycol.**, v. 12, p. 1-6, 2008.

KOPPEL, E. A.; VAN GISBERGEN, K. P.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DCSIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 157-165, 2005.

KOPP, E. B.; MEDZHITOV, R.. The Toll-like receptors family and control of innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 168, p. 2433-2440, 1999

KUMAGAI, Y.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate receptors. **J. Infect. Chemother.**, v. 14, p. 86-92, 2008.

LEE, M. S.; KIM, Y-J. Signaling pathways downstream of Pattern-Recognition – Receptors and their cross talk **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 447-480, 2007.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; GROSS, O.; ROBINSON, M. J.; OSÓRIO, F.; SLACK, E. C.; TSONI, S. V.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G. D.; RULAND, J.; REIS E SOUSA, C. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 630-639, 2007.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; FERIOTTI, C.; ARAUJO, E. F.; CALICH, V. L. MyD88 signaling is required for eficiente innate and adaptative imune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect. and Immun.**, v. 79, p. 2470-2480, 2011.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V. L. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1279-1290, 2009.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAÚJO, E. F.; LEITE, K. R.; CALICH, V. L. TLR4 signaling leads to a more severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 1078-1088, 2010.

MACKENZIE, E.; TAYLOR, P. R.; STILLION, J.; LUCAS, A. D.; HARRIS, J.; GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 4975-4983, 2007.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MCEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PTINO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165-175, 1987.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHL, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441 p. 231-234, 2006.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. p. 131-147.

MOTA, N. G.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T.; AUDI, R. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; FRANCO, M. F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 765-772, 1985.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L. G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NETEA, M. G.; FERWERDA, G.; VAN DER GRAAF, C. A.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Recognition of fungal by tool-like receptors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, p. 4195-4201, 2006.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 67-78, 2008.

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

NETEA, M. G.; VAN DE VEERDONK, F.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER J. W.; KULLBERG, B. J. 2008. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 118-123, 2008.

NETEA, M. G.; FERWERDA, G.; DE JONG, D. J.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; KRAMER, M.; NABER, T. H.; DRENTH, J. P.; GIRARDIN, S. E.; KULLBERG, B. J.; ADEMA, G. J.; VAN DER MEER, J. W. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6518-6523, 2005.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIOORDANOU, P. M. O.; BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adults forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microb. Infect.**, v. 4, p. 139-144, 2002.

OSORIO F, LEIBUNDGUT-LANDMANN S, LOCHNER M, LAHL K, SPARWASSER T, EBERL G, REIS E SOUSA C. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 3274-3281, 2008.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Antifungal defense turns 17. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 549-551, 2008.

PALMA, A. S. et al. Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using 'designer' microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 5771-5779, 2006.

- PICKERING, M. C.; BOTTO, M.; TAYLOR, P. R.; LACHMANN, P. J.; WALPORT, M. J. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis.. **Adv. Immunol.**, v. 76, p. 227-324, 2000.
- PINA, A.; SALDIVA, P. H. N.; RESTREPO, L. E. C; CALICH V. L. G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leuk. Biol.**, v. 79, p. 1202-1213, 2006.
- PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J. Leuk. Biol.**, v. 83, p. 1088-1099, 2008.
- POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.
- RESTREPO, A. The ecology of *P. brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334, 1985.
- RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 232-241, 2001.
- ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; PUCETTI, P.; BISTONI, F. Neutrophils production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 Therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.**, v. 158, p. 5349, 1997.
- ROSAS, M.; LIDDIARD, K.; KIMBERG, M.; FARO-TRINDADE, I.; MCDONALD, J. U.; WILLIAMS, D. L.; BROWN, G. D.; TAYLOR, P. R. The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. **J. Immunol.**, v. 181, p. 3549-3557, 2008.
- ROTHFUCHS, A. G.; BAFICA, A.; FENG, C. G.; et al. 2007. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 179, p. 3463 - 3471, 2007.
- SCHULERT, G. S.; ALLEN, L. A. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. **J. Leu. Biol.**, v. 80, p. 563-571, 2006.
- SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; CALICH, V. L. G. Evaluation of the pathogenicity

and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 71-82, 1989.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. The source of the growth-promoting factor (s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 30, p. 261-264, 1992.

SINGER-VERMES, L. M.; CALDEIRA, C. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, p. 75-79, 1993.

SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESI, M. C.; MAFFEI, C. M.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by IFN- γ . **Am. J. Pathol.** v. 163, p. 583-590, 2003.

SUTMULLER, R. P.; DEN BROK, M. H.; KRAMER, M.; BENNINK, E. J.; TOONEN, L. W.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN, L. A.; AKIRA, S.; NETEA, M. G.; ADEMA, G. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 485-494, 2006.

TADA, H.; NEMOTO, E.; SHIMAUCHI, H.; WATANABE, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; OHNO, N.; TAMURA, H.; SHIBATA, K.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; SUGAWARA, S.; TAKADA, H. Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, p. 503-512, 2002.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335, 2003.

TANAKA, S.; KOIZUMI, S.; MASUKO, K.; MAKIUCHI, N.; AOYAGI, Y.; QUIVY, E.; MITAMURA, R.; KANO, T.; OHKURI, T.; WAKITA, D.; CHAMOTO K.; KITAMURA, H.; NISHIMURA, T. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by Chrysanthemum coronarium L. **Int. Immunopharmacol.**, v. 11, p. 226-232. 2010.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901-944, 2005.

TAYLOR, P. R.; TSONI, S. V.; WILLMENT, J. A.; DENNEHY, K. M.; ROSAS, M.; FINDON, H.; HAYNES, K.; STEELE, C.; BOTTO, M.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. **Nat Immunol.**, v. 1, p. 31-83, 2007.

THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M. T.; ENGELE, M.; SIELING, P. A.; BARNES, P. F.; ROLLINGHOFF, M.; BOLCSKEI, P. L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGARD, M. V.; BELISLE, J. T.; GODOWSKI, P. J.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 21, p. 1544-1547, 2001.

TSONI, S. V.; BROWN, G. D. beta-Glucans and dectin-1. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1143, p. 45-60, 2008.

UNDERHILL, D. M.; ROSSNAGLE, E.; LOWELL, C. A.; SIMMONS, R. M. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. **Blood**, v 106, p. 2543-50, 2005.

UNDERHILL, D. M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. **Immunol. Rev.**, v. 219, p. 75-87, 2007.

VAN KOOYK, Y., GEIJTENBEEK, T B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 697-709, 2003.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, p. 179-189.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 22, p. 409-437, 2006.

WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 27-32, 2008.

YATES, R. M.; RUSSELL, D. G. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. **Immunity**, v. 23, p. 409-417, 2005.

YADAV, M.; SCHOREY, J. S. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. **Blood**, v. 108, p. 3168 - 3175, 2006.

YOSHITOMI, H.; SAKAGUCHI, N.; KOBAYASHI, K.; BROWN, G. D.; TAGAMI, T.; SAKIHAMA, T.; HIROTA, K.; TANAKA, S.; NOMURA, T.; MIKI, I.; GORDON, S.; AKIRA, S.; NAKAMURA, T.; SAKAGUCHI, S. A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 949-960, 2005.

ZELANTE, T.; FALLARINO, F.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. **Microbes Infect.**, v. 11, p. 133-141, 2009.

ZHOU, T.; CHEN, Y. X.; HAO, L.; ZHANG, Y. Y. DC-SIGN and Immunoregulation. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 3, p. 279-283, 2006.

ZUGHAIER, S. M.; ZIMMER, S. M.; DATTA, A.; CARLSON, R. W.; STEPHENS, D.S. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2940-2950, 2005.

TANAKA, S.; KOIZUMI, S.; MASUKO, K.; MAKIUCHI, N.; AOYAGI, Y.; QUIVY, E.; MITAMURA, R.; KANO, T.; OHKURI, T.; WAKITA, D.; CHAMOTO K.; KITAMURA, H.; NISHIMURA, T. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by *Chrysanthemum coronarium* L. **Int. Immunopharmacol.**, v. 11, p. 226-232, 2010.