Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

**Função fagocítica em leucócitos humanos silenciados
ou mutados para AIRE**

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

São Paulo
2013

Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho

**Função fagocítica em leucócitos humanos silenciados
ou mutados para AIRE**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Carvalho, Marina Uchôa Wall Barbosa de.

Função fagocítica em leucócitos humanos silenciados ou mutados para AIRE / Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunodeficiências primárias.

Versão do título para o inglês: Phagocytic function of human leukocytes silenced or mutated AIRE.

1. Candida albicans 2. Cultura de células 3. Monócitos
4. Imunopatologia 5. Imunidade natural 6. Imunologia celular
I. Neto, Prof. Dr. Antonio Condino II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia III. Título.

ICB/SBIB066/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marina Uchôa Wall Barbosa de Carvalho.

Título da Dissertação: Função fagocítica em leucócitos humanos silenciados ou mutados para AIRE.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEPESH. 049/2012

DECLARAÇÃO

Declaro que o **relatório Parcial** apresentado pela pesquisadora **Marina Uchôa W.B.de Carvalho**, referente ao projeto intitulado: "*Fagocitose e atividade microbicida contra Candida albicans em células THP-1 deficientes para AIRE 1*" foi analisado e considerado satisfatório por esta Comissão, conforme prevê a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

São Paulo, 05 de outubro de 2012.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Dedico este trabalho...

... à Deus e, principalmente, Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, principal motivo de tudo que alcancei. Graças ao seu amor incondicional, compreendi a grandeza das Suas presenças na minha vida – desde os pequenos aos grandes acontecimentos – fortalecendo, direcionando e acrescentando paz ao meu caminho sempre.

... aos meus pais, Cacá e Rosa, e meu irmão, Carlin, que dignamente me apresentaram a importância da família e ao caminho da honestidade e persistência e sempre apoiaram todas as minhas decisões. Amo vocês!

... à minha família, em especial Tio Neto, Vó Virgínia, Tia Virgínia, Tia Ana, Tio Evaldo, Ana Karina, Evaldo Filho, Leinha, Fafá, Cromwell e Mandoca por sempre me apoiarem e muitas vezes brigarem com meu pai tentando abrir os seus olhos por minha causa!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Condino, pela ajuda na orientação deste estudo e na construção de alicerces profissionais sólidos, e, principalmente, pela oportunidade concedida.

Aos Mateo e José Antônio, amigos queridos e "professores", por serem o meu "modelo profissional" e, principalmente, pelo privilégio de contar com a amizade, compreensão e encorajamento em todos os momentos, principalmente nos momentos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Ao LIH em especial Chris, Angela, Paulo Vítor, Marília, Nuria, Walmir, Stefania, Otávio e Lena, pelas conversas, conselhos, e, principalmente, por me receberem tão bem que hoje considero como minha segunda família.

Aos amigos, em especial Day, Lininha, Dani, Mari, Mira, Samuel, Lilinha e Antonio pela amizade, solidariedade e encorajamento ao longo dessa trajetória.

Aos Prof. Dr. Magnus Dias-da-Silva, Prof^a Dr^a Marize Lazaretti-Castro e Fernanda G Weiler (UNIFESP) pela inestimável colaboração.

Aos Eni, João e Celso por sempre tirarem todas as minhas dúvidas.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro concedido, sem o qual não haveria possibilidade da realização desta tese.

E à todos que de forma direta ou indireta ajudaram na confecção deste trabalho.

Vale à pena a tentativa e não o receio. Vale à pena confiar e nunca ter medo. Vale à pena encarar e não fugir da realidade. Ainda que fracasse, vale à pena lutar. Vale à pena procurar o melhor. Vale a pena ser o que for. Enfim, vale à pena viver a vida, já que a vida não é tudo que ela pode nos dar, mas sim tudo o que podemos dar por ela.

RESUMO

Carvalho MUWB. Função fagocítica em leucócitos humanos silenciados ou mutados para AIRE. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A Poliendocrinopatia Autoimune Associada a Candidíase e Distrofia ectodérmica é uma doença que apresenta auto-anticorpos e susceptibilidade a *Candida albicans*. Ainda que a autoimunidade possa ser explicada por defeitos no desenvolvimento dos linfócitos no timo, a susceptibilidade a candidíase não foi totalmente esclarecida. Recentemente, nosso grupo observou que a proteína AIRE é necessária para a via de sinalização da Dectina-1, importante para a resposta frente a *C. albicans*. No presente projeto, investigamos como a ausência de AIRE influencia em eventos específicos para o reconhecimento e eliminação do patógeno via receptor Dectina-1. Assim, avaliamos a produção de derivados reativos do oxigênio, a expressão de moléculas do sistema NADPH oxidase e a fagocitose por células de paciente com APECED ou células THP-1 silenciadas para AIRE. Observamos que não houve diferença estatística significativa no “*burst oxidativo*” e na expressão dos componentes do sistema NADPH oxidase por estas células. Estes resultados sugerem que AIRE não tem influência nos componentes do sistema NADPH oxidase. Analisamos a fagocitose e encontramos que as células THP-1 silenciadas para AIRE fagocitam menos que as células THP-1 *wild-type*, o que indica que há um defeito no reconhecimento do patógeno. Desta forma, decidimos incluir pacientes com APECED no trabalho para confirmar os dados obtidos com as células THP-1. Por esta doença ser rara, até o momento recrutamos um paciente para análise. Analisamos a expressão de moléculas do sistema NADPH nas células do paciente com APECED. Verificamos que não há diferença na expressão flavocitocromo b₅₅₈ e p40phox entre as células do paciente com APECED e controle sadio. Em paralelo, analisamos o “*burst oxidativo*” utilizando a técnica de dosagem de dihidro-rodamina. As populações CD14 positiva e CD14 negativa do paciente com APECED apresentaram uma diminuição no “*burst oxidativo*” quando estimuladas com PMA, Curdlan e Zymosan depletado por 1 h quando comparado ao controle sadio. Além disso, observamos que os PBMCs do paciente com APECED fagocitam 33% menos *C. albicans* comparado ao controle. Os resultados encontrados sugerem que há um defeito no reconhecimento do patógeno via Dectina-1, gerando uma diminuição da fagocitose de *C. albicans* que pode dificultar sua eliminação. Desta forma, este estudo pretendeu contribuir para melhor compreender os mecanismos pelos quais pacientes com APECED são susceptíveis a *C. albicans*.

Palavras-chave: AIRE. APECED. Dectina-1. Fagocitose. Burst oxidativo. Candida albicans.

ABSTRACT

Carvalho MUWB. Phagocytic function of human leukocytes silenced or mutated AIRE. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy is a syndrome with autoantibodies and susceptibility to *Candida albicans* infection. Although autoimmunity may be explained by defects in lymphocyte development in thymus, susceptibility to candida has not been fully elucidated. Our group has recently observed that AIRE protein is required for dectin-1 signaling. In this project, we investigated how the absence of AIRE influences in events specific for recognition and elimination of this pathogen via dectin-1 receptor. We evaluated reactive oxygen species production, expression of NADPH oxidase molecules, and phagocytosis by APECED patient cells or AIRE silent THP-1 cells. We did not observe statistically significant differences in the oxidative burst and expression of NADPH oxidase components by these cells. These results suggest that AIRE has no influence on the NADPH oxidase components. Phagocytosis analysis showed that AIRE silent THP-1 cells phagocytize less compared to wild-type THP-1 cells. Thus, we decided to include APECED patients to confirm data obtained with THP-1 cells. For this rare disease, we recruited one patient to date. We analyzed expression of NADPH oxidase molecules in APECED patient cells. We observed no difference in flavocytochrome b558 and *p40phox* in APECED patient cells compared to controls. In parallel, we analyzed the oxidative burst using dihydro-rhodamine dosage. CD14 positive and CD14 negative leukocyte populations from the APECED patient showed a decreased oxidative burst when stimulated with PMA, Curdlan, and Depleted Zymosan for 1 hour compared to healthy controls. Furthermore, we observed that APECED patient PBMC phagocytized *C. albicans* 33% less than control cells. Our results suggest that there is a defect in pathogen recognition via dectin-1, resulting in decrease on *C. albicans* phagocytosis that can hamper their elimination. Thus, this study intended to contribute to better understand the mechanisms by which APECED patients are susceptible to *C. albicans*.

Keywords: AIRE. APECED. Dectin-1. Phagocytosis. Oxidative Burst. *Candida albicans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sequência de experimentos realizados com células THP-1 e células de sangue periférico humano	26
Figura 2 - Dosagem de Ânion Superóxido em células THP-1	32
Figura 3 - Representação gráfica do <i>gate</i> selecionado para as células THP-1	33
Figura 4 - Ensaio DHR em células THP-1 não-tratadas com IFN- γ e TNF- α ...	34
Figura 5 - Ensaio DHR em células THP-1 tratadas com IFN- γ e TNF- α	35
Figura 6 - Expressão de citocromo b_{558} em células THP-1	36
Figura 7 - Expressão de p40 <i>phox</i> em células THP-1	37
Figura 8 - Expressão de p47 <i>phox</i> em células THP-1	37
Figura 9 - Expressão de p67 <i>phox</i> em células THP-1	38
Figura 10 - Avaliação do índice fagocítico em células THP-1	39
Figura 11 - Representação gráfica do <i>gate</i> selecionado para granulócitos e monócitos	40
Figura 12 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} em granulócitos e monócitos de paciente com APECED e controle sadio	41
Figura 13 - Ensaio DHR nos granulócitos de paciente com APECED	43
Figura 14 - Ensaio DHR na população de monócitos do paciente com APECED	44
Figura 15 - Ensaio DHR da população CD14+ de paciente com APECED e controle sadio	45
Figura 16 - Ensaio DHR da população CD14- de paciente com APECED e controle sadio	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva dose-resposta de Zymosan Depletado para estimulação das células células THP-1	33
Tabela 2 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de granulócitos de paciente com APECED	40
Tabela 3 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de monócitos de paciente com APECED	41
Tabela 4 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de CD14+ de paciente com APECED	42
Tabela 5 - Expressão de $p40phox$ da população CD14+	42
Tabela 6 - Ensaio DHR da população de granulócitos de controle sadio e paciente com APECED	43
Tabela 7 - Ensaio DHR da população de monócitos de paciente com APECED e controle sadio	44
Tabela 8 - Ensaio DHR da população CD14+ de paciente com APECED e controle sadio	45
Tabela 9 - Ensaio DHR da população CD14- de paciente com APECED e controle sadio	46
Tabela 10 - Índice fagocítico do paciente com APECED e controle sadio	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIRE	regulador autoimune, do inglês <i>Autoimmune Regulator</i>
APECED	poliendocrinopatia autoimune associada a candidíase e distrofia ectodérmica, do inglês <i>autoimmune poliendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy</i>
BCL10	do inglês <i>B-cell lymphoma 10</i>
CARD9	do inglês <i>Caspase recruitment domain 9</i>
DAG	diaciglicerol
DCs	células dendríticas
DHR	dihidrorodamina
HIV	vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
IFN- γ	interferon gama
IL-17	interleucina 17
ITAMs	motivo de ativação baseado em tirosina, do inglês <i>immunoreceptor tyrosin-based activation motif</i>
JNK	do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LTC	Lectina tipo C
MALT1	do inglês <i>mucosa-associated lymphoid tissue transformation protein 1</i>
MHC	do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MPO	mieloperoxidase
mTECs	células epiteliais da medula tímica
NF- κ B	do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NFAT	do inglês <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
PBMC	células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PHD	do inglês <i>plant homeodomais</i>
PKC	proteína quinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
PMA	acetato de forbol miristato, do inglês <i>phorbol-myristate-acetate</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SOD	superóxido dismutase
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>

LISTA DE FÓRMULAS

H^+	hidrogênio livre
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HOCL	ácido hipocloroso
O_2^-	ânion superóxido
OH^-	radical hidroxila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 AIRE	16
1.2 APECED	17
1.3 <i>Candida albicans</i>	17
1.4 Dectina-1	19
1.5 Fagocitose	20
1.6 Sistema NADPH oxidase e Reativos do Oxigênio	20
1.7 AIRE e Dectina-1	22
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Algoritmos da Metodologia	26
3.2 Obtenção de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico	26
3.3 Linhagem THP-1	27
3.4 Dosagem de Ânion Superóxido por redução de Citocromo c	28
3.5 Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	28
3.6 Citometria de Fluxo	29
3.7 Atividade fagocítica – <i>C. albicans</i>	29
3.8 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Células THP-1	32
4.2 Paciente com APECED	39
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 AIRE

A proteína AIRE (*AutoImmune REgulator*) é expressa, principalmente, no timo, mas também é encontrada nos linfonodos, baço e células do sangue periférico. O gene *AIRE* localiza-se no cromossomo 21, tem aproximadamente 13kb, é composto por 14 exons que codificam uma proteína de aproximadamente 57kDa contendo 552 aminoácidos (Weiler et al., 2011). Esta proteína possui uma combinação de domínios funcionais: o domínio N-terminal CARD (recrutamento de caspase), um domínio SAND (SP100, AIRE, Nuc p41/75, DEAF) localizado no meio da proteína e dois PHD (plant homeodomains) *zinc fingers* na região C-terminal, o que sugere AIRE ter um papel na transcrição (Kisand, Peterson, 2011). Possui, também, quatro motivos LXXLL intercalados, típico de proteínas que se ligam a receptores nucleares (ligações proteína-proteína podem ocorrer) (Plevin et al., 2005).

Quando AIRE fosforila e dimerizada, liga-se a sequências de DNA que são conhecidas por outras proteínas, que como AIRE, possuem *zinc-finger* e motivos de leucina. Estudos *in vitro* mostraram que AIRE tem afinidade por duas sequências: TATA-*like box* (TTATTA) e uma repetição em *tandem* de um G-*box* (ATTGGTTA) (Pereira et al., 2005). Outro estudo demonstrou que o primeiro PHD de AIRE possui atividade uma E3 ligase, sendo necessária para a modificação de proteínas que interagem com AIRE e localizar corretamente o sítio de ativação transcricional (Uchida et al., 2004)

AIRE é uma proteína que promove a expressão ectópica de um grupo de antígenos tecido-específicos pelas células epiteliais da medula tímica (mTECs), gerando uma auto-tolerância nas células T durante sua maturação no timo (Peterson et al, 2008). Esta proteína é um fator pró-apoptótico e pode induzir tolerância das células T de forma indireta pela apresentação por células dendríticas (DCs) que engolfaram antígenos provenientes das mTECS que sofreram apoptose induzida por AIRE (Gray et al, 2007).

As mutações em AIRE levam ao desenvolvimento da Poliendocrinopatia Autoimune Associada à Candidíase e Distrofia Ectodérmica (APECED) (Björnses et al., 2000; Mathis, Benvist, 2009).

1.2 AIRE e APECED

APECED é uma síndrome caracterizada pela presença de autoanticorpos para diversos antígenos e infiltração de linfócitos autoreativos em diversos órgãos. O diagnóstico clínico é definido com a associação de dois dos três principais sintomas da doença: hipoparatiroidismo, hipoadrenalismo e candidíase crônica (Björse, 2000). Além dessas manifestações principais os pacientes podem desenvolver outras doenças autoimunes, como hipoplasia do baço, diabetes tipo 1, distrofia ectodérmica, alopecia, vitiligo entre outras (Mathis, Benvist, 2009; Weiler et al., 2012). Além da auto-imunidade, outra característica destes pacientes é a elevada suscetibilidade a desenvolver infecções crônicas e recorrentes por *Candida albicans* (Björse, 2000).

A suscetibilidade a candidíase nos pacientes com APECED pode ser explicada, pelos menos em parte, pela produção de anticorpos contra IL-17 ou receptores de IL-17 (Ng et al., 2010). No entanto, alguns pacientes não apresentam tais auto-anticorpos e são susceptíveis a *C. albicans* (Ng et al., 2010). Estudos recentes demonstraram que monócitos de pacientes com APECED apresentam um defeito na internalização de Zymosan e uma diminuição da atividade das tirosina-quinases, após estímulo com antígenos de *C. albicans* (Brännström et al., 2006). Já as células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com APECED, apresentam uma diminuição na liberação de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-13 em resposta ao estímulo com antígenos de *C. albicans* (Ryan et al., 2008).

Embora esses estudos mostrem que a suscetibilidade a candidíase nos pacientes com APECED esteja ligada a defeitos nas células da imunidade inata, o mecanismo que leva a esses defeitos nos monócitos ainda não foi descrito.

1.3 *Candida albicans*

Candida albicans é um patógeno oportunista que coloniza as superfícies das mucosas em pelo menos 30% da população saudável (Netea, Maródi, 2010). Normalmente não gera enfermidade, no entanto *C. albicans* pode tornar-se patogênica quando há alterações no meio-ambiente local, microbiota alterada ou defesa local imunocomprometida, entre outros (Moyes, Naglik, 2011). Em pacientes susceptíveis, é o terceiro agente mais frequentemente isolado de culturas

sanguíneas, após *Staphylococcus* coagulase-negativos e *S. aureus* (Destin et al., 2009; Shibata et al., 2012). As infecções por *C. albicans* são facilitadas por lesões nas mucosas ou por deficiências nos mecanismos de defesa do sistema imune primários ou secundários como: APECED ou infecção por HIV (Gow, Hube, 2012; Peltroche-Llacsahuanga et al., 2000; Shibata et al., 2012).

Os neutrófilos são reconhecidos como células efetoras chave para o controle de infecções fúngicas e atuam como primeira linha de defesa destruindo os microrganismos pela produção de derivados reativos de oxigênio e outros agentes microbicidas (Destin et al., 2009). Além dos neutrófilos, os macrófagos também participam do combate a infecção por *C. albicans*, atuando no reconhecimento do patógeno, na secreção de TNF- α e ácido aracídico e no aumento da expressão de COX2 (ciclooxigenase-2) (Filler, 2006).

Os carboidratos representam 80-90% da parede celular da *C. albicans* e seus constituintes principais são β -glucanos, quitina e manana associado a proteínas. A parede celular também contém 6-25% de proteínas e lipídeos 1-7% (Chaffin et al., 1998; Gow, Hube, 2012).

A *Candida* possui diversos fatores de virulência que incluem produção de enzimas hidrolíticas, variabilidade antigênica e mudança na morfologia de levedura para pseudo-hifas e hifas, este último consistindo em uma forma de evasão do sistema imunológico (Chaffin et al., 1998). Na morfologia de hifas, as células fúngicas são consideravelmente maiores que os neutrófilos e macrófagos, não sendo possível serem fagocitadas. Já na forma de levedura, estes fungos são fagocitados, destruídos e seus peptídeos antigênicos serão apresentados associados ao MHC classe II na superfície das células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) (Skrzypek et al., 2009).

A ativação do sistema imune inato por *C. albicans* ocorre através do seu reconhecimento por receptores como: TLR, receptor Lectina tipo C (LTC), entre outros (Ferwerda et al., 2010; Hanna, Etzoni, 2011). O reconhecimento por esses receptores polarizam para uma resposta Th17. Dentre estes receptores, os LTC, principalmente o receptor Dectina-1, possui papel fundamental na resposta a *C. albicans* (Hanna, Etzoni, 2011).

1.4 Dectina-1

Inicialmente, o receptor Dectina-1 foi descrito com sendo um receptor específico das células dendríticas. Atualmente, sabe-se que este receptor é expresso em vários tipos celulares como monócitos, macrófagos e neutrófilos. Foi demonstrado que este receptor, nos leucócitos, é o receptor primário para β -glucano de fungos e este reconhecimento gera respostas celulares, como fagocitose, maturação de células dendríticas, “*burst oxidativo*”, produção de metabólitos do ácido aracdônico e várias citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), IL-10, IL-2, IL-23, e IL-6, bem como quimiocinas, CXCL2 (Marakalala et al., 2010).

O receptor Dectina-1 é transmembrana glicosilado tipo II e possui um domínio C-lectina na porção extracelular. Este receptor possui duas vias de ativação do NF- κ B, uma dependente de Syk e outra dependente de Raf-1 (Reid et al., 2009). Embora pouco caracterizada, sabe-se que a quinase Raf-1 é diretamente fosforilada pelo receptor Dectina-1, o que também leva a ativação da via canônica do NF- κ B e antagoniza a ativação de RelB induzida por Syk (Geijtenbeek, Gringhuis, 2009; Xie, 2012).

A sinalização intracelular do receptor Dectina-1 é iniciada por um motivo hemITAM (diferentemente dos ITAMs convencionais, este possui apenas um único YXXL), que é fosforilado por quinases Src, gerando um sítio de ligação para a proteína Syk, mediante seus dois domínios SH2. É interessante que, embora sejam necessários dois domínios SH2 de Syk, um único motivo hemITAM presente no receptor Dectina-1 é suficiente para ativar esta via, o que a torna importante para o entendimento da sinalização baseada nos motivos ITAMs (Colonna, 2007). A Proteína Syk é uma quinase que, mediante mecanismos desconhecidos até agora, ativa a formação de um complexo integrado pelas proteínas CARD9 (*Caspase recruitment Domain 9*), MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue transformation protein 1*) e BCL10 (*B-cell lymphoma 10*), essencial para a ativação das vias canônica e não canônica (RelB) do NF- κ B (Xie, 2012). A sinalização de Syk também leva a ativação das cascatas de p38, ERK, JNK e NFAT (Xie, 2012).

Estudos mostraram a interação da Dectina-1 com várias espécies de fungos como *Candida*, *Pneumocystis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Coccidioides* e *Penicillium*, devido a especificidade ao β -glucano (Marakalala et al., 2010). Donine e colaboradores (2007) demonstraram que a Dectina-1, está relacionada com a

ativação do sistema NADPH oxidase em células dendríticas. A ativação do receptor Dectina-1 pela ligação com β -glucano aumentou significativamente a produção de O_2^- e a inibição de Dectina-1 com um inibidor específico, laminarina, levou a uma diminuição nessa produção, mostrando que a produção de O_2^- é dependente da ativação do receptor Dectina-1 (Donine et al., 2007).

1.5 Fagocitose

A fagocitose é o processo de ingestão de patógenos, restos celulares e células apoptóticas. Este processo possui três características principais: ocorre a ingestão de partículas maiores que 0,5 μ m de diâmetro; inicia-se pelo reconhecimento de moléculas opsonizadas ou dos padrões moleculares associados a patógenos pelos seus respectivos receptores; o complexo receptor-ligante induz a reorganização local do citoesqueleto de actina que direciona o engolfamento da partícula (Karavitis, Kovacs, 2011).

O processo de fagocitose mediado pelo receptor Dectina-1 envolve a extensão dos pseudópodes da membrana plasmática engolfando o alvo com posterior internalização. A oligomerização deste receptor é necessária para este processo pois aumenta a avidéz da ligação e permite a imobilização da partícula para a internalização, além de permitir o início da transdução do sinal para o induzir a fagocitose e outras respostas (Goodridge et al., 2012).

Após a internalização das partículas, o fagossomo sofre maturação, criando uma organela microbicida e degradativa. O fagossomo maduro interage sucessivamente com vários subcompartimentos para gerar vacúolos com propriedades bioquímicas distintas. Os estágios de maturação do fagossomo são: inicial, intermediário, tardio e fagolisossomo. Os fagossomos maduros tornam-se ácidos devido a liberação de H^+ dentro do lumen. Além disso, eles aumentam o poder microbicida devido o enriquecimento com várias moléculas antimicrobianas como: lactoferrina, peptídeos cationicos, catepsinas e espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Flannagan et al., 2011).

1.6 Sistema NADPH oxidase e Reativos do Oxigênio

O “*burst oxidativo*” é um fenômeno metabólico realizado pelo sistema NADPH

e ocorre nos fagócitos, como monócitos/macrófagos e neutrófilos, em resposta a estímulos (inflamatórios ou infecciosos) e ocorre juntamente com a fagocitose. O sistema NADPH é um sistema enzimático multicomponente que catalisa a doação de um elétron ao oxigênio molecular transformando-o em superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio (Bjorkman et al, 2008; El-Benna, 2009; Kotsias et al, 2012; Leusen et al., 1996). A NADPH oxidase pode ser ativada via receptor pelo reconhecimento de fragmentos microbianos, zymosan opsonizado, látex entre outros, como por mecanismos independentes de receptores (por exemplo: diacilglicerol – DAG e ativadores de PKC – como o miristato de forbol acetato PMA) (Bokoch, 1995; Chiurciu, Maccarone, 2011).

O sistema NADPH é constituído por seis componentes principais, sendo 4 encontrados no citosol dos fagócitos, p47-*phox*, p67-*phox* e p40-*phox*, rac1 (nos monócitos) ou rac2 (nos neutrófilos), e 2 encontrados na membrana, p22-*phox*, gp91-*phox* (El-Benna et al., 2009).

A ativação dos fagócitos leva à fosforilação, ativação e associação dos componentes deste complexo enzimático. O primeiro componente a ser fosforilado é o p47*phox*, fazendo com que ele próprio e os demais componentes migrem para a membrana e se associam ao citocromo *b*₅₅₈ (p22-*phox* e gp91-*phox*) (Winterbourn, Kettle, 2012). Ao mesmo tempo, a Rac-GDP incorpora um ATP tornando-se Rac-GTP, migrando também para o citocromo *b*₅₅₈. O citocromo é então acionado pela p67*phox* e pela Rac, iniciando o funcionamento do sistema (Dang et al., 2001). Uma vez ativado, este sistema forma uma rede de transporte de elétrons transmembrana que resulta na oxidação do NADPH na superfície citoplasmática e na geração de superóxido na superfície externa da membrana, expresso na seguinte reação (Aabdalla, 2001; Winterbourn, Kettle, 2012):

O ânion superóxido (O_2^-) produzido é em sequência convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que juntamente com o cloreto é convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), pela enzima mieloperoxidase (MPO), expresso na seguinte reação (Burg, Pillinger, 2001):

As espécies reativas do oxigênio atuam oxidando componentes presentes nos microrganismos o que gera compostos tóxicos que atuam na morte desses

patógenos (Winterbourn, Kettle, 2012).

1.7 AIRE e Dectina-1

Recentemente, nosso grupo avaliou a atividade do receptor Dectina-1 em monócitos de pacientes com APECED e no modelo *in vitro* de deficiência de AIRE. Demonstramos que esses pacientes apresentam um defeito na liberação de TNF- α induzida por β -glucano via receptor Dectina-1. Também foi demonstrado nos monócitos THP-1 que AIRE interage com o receptor Dectina-1, Syk e CARD9, de uma forma dependente do estímulo com Curdlan (específico para Dectina-1). Este fenômeno acontece durante a primeira hora de estímulo, sugerindo que AIRE é importante nos eventos imediatos na via de sinalização deste receptor, demonstrando que AIRE tem um papel extra-tímico, importante na imunidade inata (Pedroza et al., 2011).

A proteína AIRE é importante para a ativação do NF-kB via receptor Dectina-1 e a ativação desse receptor induz a produção de ROS pelo sistema NADPH. Desta forma, a nossa hipótese é que AIRE possa ter um papel importante nos eventos que levam a ativação do sistema NADPH oxidase e atividade fagocítica contra *C. albicans*. Assim, na ausência de AIRE, esperamos encontrar uma alteração na produção de reativos do oxigênio (ROS), após ativação específica do receptor Dectina-1, o que deve afetar a atividade microbicida contra *Candida* nas células deficientes de AIRE. Os experimentos propostos pretendem contribuir para o entendimento do papel da proteína AIRE no ambiente do sistema NADPH oxidase e a compreensão dos mecanismos que levam os pacientes APECED a desenvolver infecções por *C. albicans*.

2 OBJETIVOS

Avaliar em células THP-1 e células do sangue periférico de pacientes com APECED

- a) Dosagem de Ânion Superóxido
- b) Dosagem de Peróxido de Hidrogênio
- c) A atividade fagocítica – *C. albicans*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Algoritmos da Metodologia

Os algoritmos da figura abaixo trazem os procedimentos realizados com linhagem celular e células do sangue periférico humano.

Figura 1 - Sequência de experimentos realizados com células THP-1 e células de sangue periférico humano

3.2 Obtenção de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico

A amostra do paciente com APECED foi encaminhada pelo grupo de pesquisa da Dra. Marize Lazaretti Castro, UNIFESP. O paciente selecionado foi diagnosticado com APECED e o sequenciamento mostrou uma mutação no gene *AIRE* (Weiler et al., 2012).

Os granulócitos (PMN) e células mononucleares (PBMC) foram obtidos a partir de 20 mL de sangue periférico coletados de indivíduo controle e da paciente com APECED. Para os ensaios de citometria de fluxo foram utilizadas alíquotas de 150 µL sangue que foram lisadas com a 2 mL de RBC Lysis Solution (Qiagen, Maryland, USA), segundo instruções do fabricante. Em seguida, as células separadas foram lavadas com PBS e centrifugadas a 600 xg durante 10 min para “lavar” o “pellet”. Em seguida o “pellet” foi ressuspensionado em 100 µL de PBS.

Para o ensaio de fagocitose os PBMCs foram obtidos por fracionamento em

gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque (densidade = 1,077 g/ml, GE Healthcare, Uppsala, Suécia), segundo instruções do fabricante. Em seguida as células mononucleares já separadas foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37 °C, em atmosfera úmida, saturada em 5% de CO₂, em condições livre de endotoxina (<10 pg/mL).

3.3 Linhagem THP-1

A linhagem celular THP-1 silenciada para AIRE foi estabelecida em nosso grupo por Luis Alberto Pedroza (Pedroza et al., 2011). As células THP-1 foram transfectadas com um vetor lentiviral que contém a sequência codante do shRNA específico para inibir a expressão do gene AIRE. As células foram cultivadas usando meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, contendo antibiótico de seleção 2,5 µg/ml puromicina e a expressão do AIRE foi monitorada usando a técnica de real-time PCR e citometria de fluxo. Apenas clones com pelo menos 75% de inibição na expressão do AIRE foram selecionados para as etapas posteriores. Aqueles clones que apresentem menos de 25% de inibição ou transfectados com shRNA controle foram usados como controles negativos (Pedroza et al., 2011).

A linhagem de células pró-monocíticas humanas, THP-1, foi mantida no nosso laboratório cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas, fazendo-se repiques a cada 8×10^6 células por garrafa de 25 cm².

Células THP-1 deficientes para AIRE previamente estabelecidas em nosso laboratório por transfecção lentiviral de ShRNA específico para AIRE foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo adicionado de 2,5 µg/ml puromicina a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Para os experimentos de análise da produção de ânion superóxido e ensaio de dihidrorodamina, as células THP-1 foram tratadas com 100 U/mL de interferon-

gama (INF- γ) em associação com 1000 U/mL de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por um período de 48 horas.

3.4 Dosagem de Ânion Superóxido por redução de Citocromo c

Para avaliar a produção de ânion superóxido, utilizamos a técnica de dosagem já estabelecida em nosso laboratório (Condino-Neto et al., 1998). Essa técnica tem como princípio a avaliação espectrofotométrica da redução do citocromo c por superóxidos, tendo como controle a inibição da reação pela adição de superóxido dismutase (SOD) (Condino-Neto et al., 1998).

As células (THP-1: *wild-type*, controle-vetor vazio e deficiente de AIRE) foram ressuspensas na concentração final de 1×10^6 células/ml e incubadas com 90nM de PMA ou 100 μ g/mL de Curdlan na presença de 80 μ M de citocromo c durante 1 h a 37 °C. A reação com liberação espontânea foi avaliada usando-se PBS. A absorbância dos sobrenadantes foi medida em comprimento de onda de 550nm. A concentração do reativo produzido será calculada usando-se um coeficiente de extinção de $21100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em nmols/ 10^6 células/hora.

3.5 Teste da Dihidro-rodamina (DHR)

O ensaio de Dihidro-rodamina é um método semi-quantitativo utilizado para a avaliação do “*burst oxidativo*”. A dihidro-rodamina penetra nas células e, após o “*burst oxidativo*”, é oxidada à rodamina, que é uma molécula passível de ser excitada e emitir uma fluorescência (Mauch et al., 2007)

Para realizar esta análise, meio RPMI contendo $2,5 \times 10^6$ células THP-1 foram centrifugadas a 500 xg durante 3 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com PBS. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 500 xg durante 10 min para “lavar” o “pellet”. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 500 μ L de PBS. Após a ressuspensão, alíquotas da suspensão celular foram transferidas para tubos de citometria de fluxo. Foram utilizados tubos contendo amostras do paciente e do indivíduo controle, após a etapa da lise das hemácias. Cada tubo foi individualmente estimulado com 90 nM de PMA, 100 μ g/mL de CURDLAN e 100 μ g/mL de Zymosan depletado durante 1 h

a 37 °C e 400 ng/mL de dihidro-rodamina e um último tubo foi incubado apenas com PBS como controle negativo. A suspensão celular foi lavada novamente com PBS e ressuspensa em 300 µL em PBS. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

As análises de FACS foram feitas utilizando-se o aparelho BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), sendo coletados 30000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software FlowJo (Tree Star Inc., OR, EUA).

3.6 Expressão dos componentes do sistema NADPH oxidase

As células THP-1 estimuladas ou não com INF-γ e TNF-α por 48 hrs foram incubadas com o anticorpo anti-flavocitocromo b558-FITC BD Biosciences 1:50 por 30 min a 4 °C para marcação das proteínas extracelulares. Após a incubação procedeu-se à lavagem celular com PBS e as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS por tubo para posterior análise no citômetro de fluxo. Para a marcação das proteínas intracelulares em novos tubos as células THP-1 foram adicionadas e posteriormente permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%) e marcadas pela incubação destas com os anticorpos monoclonais: p40phox-FITC, p47phox-PE, p67phox-PerCP (BD Biosciences). Após a marcação, as células foram lavadas com PBS centrifugadas em 500 xg por 5 min a 4 °C e ressuspensas em PBS para leitura no citômetro de fluxo. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra do paciente com APECED após a marcação com anti-CD14. O citômetro de fluxo utilizado foi o FACSCantoII™ BD Biosciences. As análises das aquisições foram realizadas no programa FlowJo (Tree Star Inc., OR, EUA).

3.7 Atividade fagocítica – *C. albicans*

A *C. albicans* (SC5314) foi cultivada *overnight* em meio Sabouraud a 37 °C. Após a cultura, as leveduras foram lavadas em PBS e ressuspensas em PBS. A *C. albicans* foi inativada a 65 °C por 1 h. Foi adicionado 2×10^5 *C. albicans* (MOI 1:1) aos tubos contendo 2×10^5 células em meio RPMI em placas de 96 poços. Após o tempo de 1 h, foi realizado um citospin 500 rpm, 5 min (Serocito® Centrifuge mod2400 FANEM® SP-BR) seguido de coloração hematoxilina-eosina. Para análise

do índice de fagocitose foram contadas 100 células por lâmina por microscopia de luz. Cada amostra foi feita em duplicata.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para determinar diferença estatística quando as amostras não apresentavam distribuição gaussiana, ou seja, não passaram no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar mais de dois grupos, seguido pelo teste Dunns para determinar em qual grupo encontrava-se a diferença.

4.1 Células THP-1

A técnica de Dosagem de Ânion Superóxido por redução de Citocromo c visa analisar a atividade da NADPH oxidase medindo-se a liberação de superóxido por meio da redução do Citocromo c especificamente inibida pela superóxido dismutase (SOD) (Condino-Neto et al., 1998). As células THP-1 *wild-type*, vetor vazio e silenciadas para AIRE foram estimuladas com PMA como controle positivo e Curdlan como agonista do receptor Dectina-1 durante 1 hora.

No ensaio de dosagem de ânion superóxido observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos celulares *wild-type* (WT), vetor vazio – controle (CTL) e silenciadas para AIRE (KD) (**Figura 2**). Sendo assim, foi realizado o ensaio DHR como método adicional de avaliação do sistema NADPH oxidase.

Figura 2 - Dosagem de Ânion Superóxido em células THP-1

Liberação de ânion superóxido em células THP-1 *wild-type* (WT), controle (CTL - vetor vazio) e silenciadas para AIRE (KD) tratadas com 100 U/mL de IFN- γ em associação com 1000 U/mL de TNF- α por 48 horas, estimuladas por 1 hora com 90nM de PMA e 100 μ g/mL de Curdlan por redução de citocromo c. Não Estimulado (NE); Phorbol myristate-acetate (PMA); Agonista de Dectina-1 (Curdlan). Células THP-1 WT em preto, Células THP-1 CTL em grafite e Células THP-1 KD em cinza. N=3, mediana e máximo, $p>0,05$, teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

Inicialmente realizamos uma curva dose-resposta para escolher qual a melhor concentração do Zymosan Depletado que deveria ser utilizada (**Tabela 1**). O Zymosan depletado passa por um processo onde há depleção dos componentes que se ligariam ao TLR-2, ligando-se apenas ao receptor Dectina-1.

Tabela 1 - Curva dose-resposta de Zymosan Depletado para estimulação das células THP-1

	Não estimulado	PMA 90nM	Zymosan depletado 100µg/mL	Zymosan depletado 250µg/mL	Zymosan depletado 500µg/mL
<i>Wild-type</i>	162	205	174	147	145

As células THP-1 *wild-type* foram estimuladas com 90nM de PMA ou 100 µg/mL, 250µg/mL ou 500µg/mL Zymosan depletado durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “burst oxidativo” por citometria de fluxo. Os resultados expressão a mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

No ensaio de DHR, o *gate* das células foi selecionado de acordo com o tamanho (FSC) e granulosidade/complexidade (SSC) das células THP-1 *wild-type* não tratadas com IFN-γ em associação com TNF-α (**Figura 3**).

Figura 3 - Representação gráfica do *gate* selecionado para as células THP-1

Representação do *gate* selecionado de acordo com o tamanho (FSC) e granulosidade/complexidade (SSC) das células THP-1 *wild-type* (WT) e deficientes para AIRE (KD AIRE). Avaliação do “burst oxidativo”. Representativo de três experimentos independentes.

Inicialmente, analisamos apenas as células THP-1 não-tratadas com IFN-γ e TNF-α. Não houve diferença estatística significativa entre as as células THP-1 silenciadas para AIRE e as células THP-1 *wild-type* (**Figura 4**).

Figura 4 - Ensaio DHR em células THP-1 não-tratadas com IFN- γ e TNF- α

As células THP-1 foram estimuladas com 90nM de PMA, 100 μ g/mL CURDLAN e 100 μ g/mL de Zymosan depletado durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “burst oxidativo” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Células THP-1 *wild-type* (WT) em preto e deficientes para AIRE (KD) em cinza. NE=não estimulado; PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1. N=3, mediana e máximo, $p>0,05$, teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

Observando a mediana de intensidade de fluorescência das células THP-1 tratadas com IFN- γ e TNF- α por 48 horas não observamos diferença estatisticamente significativa entre as células THP-1 *wild-type* e células THP-1 silenciadas para AIRE (**Figura 5**).

Figura 5 - Ensaio DHR em células THP-1 tratadas com IFN- γ e TNF- α

As células THP-1 tratadas com 100 U/mL de IFN- γ em associação com 1000 U/mL de TNF- α por 48 horas foram estimuladas com 90nM de PMA, 100 μ g/mL CURDLAN e 100 μ g/mL de Zymosan depletado durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Células THP-1 *wild-type* (WT) em preto e deficientes para AIRE (KO) em cinza. NE=não estimulado; PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1. N=3, mediana e máximo, $p>0,05$, teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

Posteriormente analisamos a expressão de componente do sistema NADPH oxidase, uma vez que não observamos diferenças na “*burst oxidativo*” entre as células THP-1 WT e KD. Inicialmente, observamos a expressão do citocromo b558, composto pelos componentes de membrana (gp91 $phox$ e p22 $phox$). Não houve diferença estatística significativa entre as células THP-1 *wild-type* e silenciadas para AIRE não tratadas com IFN- γ e TNF- α (**Figura 6A**). O mesmo foi observado nas células THP-1 WT e KD tratadas com IFN- γ e TNF- α por 48 horas (**Figura 6B**).

Figura 6 - Expressão de citocromo b_{558} em células THP-1

As células THP-1 não tratadas (A) e células THP-1 tratadas com 100 U/mL de IFN- γ em associação com 1000 U/mL de TNF- α por 48 horas (B) foram marcadas com anticorpo Anti- Flavocitocromo b_{558} para avaliação da expressão de Flavocitocromo b_{558} por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as células THP-1 *wild-type* (WT) e silenciadas para AIRE (KD). Células THP-1 WT em preto e KD em cinza. NM=Não Marcado, Cit b_{558} = Citocromo b_{558} . N=5, mediana e máximo, $p>0,05$, Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

Analisamos a expressão dos componentes citoplasmáticos do sistema NADPH oxidase: *p40phox*, *p47phox* e *p67phox*. Observamos a expressão de *p40phox* e não observamos diferença estatística significativa entre as células THP-1 *wild-type* e silenciadas para AIRE não tratadas com IFN- γ e TNF- α (**Figura 7A**). O mesmo foi visualizado com as células THP-1 tratadas com IFN- γ e TNF- α por 48 horas (**Figura 7B**).

A análise da expressão de *p47phox* não mostrou diferença estatística significativa entre as células THP-1 *wild-type* e silenciadas para AIRE não tratadas com IFN- γ e TNF- α (**Figura 8A**). Também não encontramos diferença entre as células THP-1 WT e KD tratadas com IFN- γ e TNF- α por 48 horas (**Figura 8B**).

Figura 7 - Expressão de *p40phox* em células THP-1

As células THP-1 não tratadas (A) e células THP-1 tratadas com 100 U/mL de IFN- γ em associação com 1000 U/mL de TNF- α por 48 horas (B) foram marcadas anticorpo Anti-p40phox para avaliação da expressão de p40phox por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as células THP-1 *wild-type* (WT) e silenciadas para AIRE (KD). Células THP-1 WT em preto e KD em cinza. NM=Não Marcado, Cit b558= Citocromo b₅₅₈. N=5, mediana e máximo, $p>0,05$, Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

Na análise da expressão de p47phox não verificamos diferença estatística significativa entre as células THP-1 *wild-type* e silenciadas para AIRE não tratadas com IFN- γ e TNF- α (**Figura 8A**). O mesmo resultado foi constatado nas células THP-1 WT e KD tratadas com IFN- γ e TNF- α por 48 horas (**Figura 8B**).

Figura 8 - Expressão de *p47phox* em células THP-1 não-tratadas

As células THP-1 não tratadas (A) e tratadas com 100 U/mL de IFN- γ (1000U/mL) TNF- α por 48 horas (B) foram marcadas com anti-p47phox para avaliação da expressão de p47phox por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). Não houve diferença estatística significativa entre as células THP-1 *wild-type* (WT – em preto) e silenciadas para AIRE (KD – em cinza). NM=Não Marcado. N=5, mediana e máximo, $p>0,05$, Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

A expressão de *p67phox* mostrou-se de forma semelhante entre as células THP-1 *wild-type* e silenciadas para AIRE não tratadas com IFN- γ e TNF- α sem diferença estatística significativa (**Figura 9A**). O mesmo foi observado com as células THP-1 WT e KD tratadas com IFN- γ e TNF- α por 48 horas (**Figura 9B**).

Figura 9 - Expressão de *p67phox* em células THP-1

As células THP-1 não tratadas (A) e células THP-1 tratadas com IFN- γ (100u/mL) TNF- α (1000U/mL) por 48 horas (B) foram marcadas com anticorpo anti-*p67phox* para avaliação da expressão de *p67phox* citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as células THP-1 *wild-type* (WT – em preto) e silenciadas para AIRE (KD – em cinza). NM=Não Marcado. N=5, mediana, mínimo e máximo, $p>0,05$, Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

Como não observamos diferenças no sistema NADPH entre células THP-1 WT e KD, avaliamos o índice fagocítico destas células. Encontramos que as células THP-1 silenciadas para AIRE fagocitam significativamente menos que as células THP-1 *wild-type* (**Figura 10**).

Figura 10 - Avaliação do índice fagocítico em células THP-1

As células THP-1 não tratadas foram incubadas com *C. albicans* (MOI 1:1) por 1,5h a 37°C para avaliar o índice de fagocitose. Foi observado 100 células contadas por microscopia de luz em lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Células THP-1 silenciadas para AIRE (KD – em cinza) fagocitam significativamente menos que as células THP-1 *wild-type* (WT) em preto e deficientes para AIRE (KD) em cinza. N=3, mediana e máximo, (*)p=0,05, teste Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

4.2 Paciente APECED

A amostra de sangue do paciente com APECED com mutação confirmada no gene AIRE foi encaminhada pelo grupo da Professora Dr^a Marise Lazaretti-Castro do Departamento de Endocrinologia da UNIFESP (Weiler et al., 2012).

Inicialmente analisamos a expressão de alguns componentes do sistema NADPH oxidase. Desta forma, analisamos a expressão do Flavocitocromo b₅₅₈ por citometria de fluxo. As populações de granulócitos e monócitos foram selecionadas de acordo com o tamanho (FSC) e complexidade/granulosidade (SSC) celular. Na **Figura 11** é possível observar a seleção realizada para cada tipo celular. Podemos observar que a população de monócitos do paciente é menor, quando comparado com o controle. Entretanto, só podemos saber se essa diminuição na população de monócitos é característico dos pacientes com APECED com a análise de um número maior pacientes.

Figura 11 - Representação gráfica do *gate* selecionado para granulócitos e monócitos

Representação do *gate* selecionado de acordo com tamanho (FCS) e granulosidade/complexidade (SSC) em células do controle e do paciente com APECED. Ensaio DHR. Não estimulado.

A análise da população de granulócitos que expressam Flavocitocromo b_{558} (Cit b_{558}) se apresenta de forma semelhante tanto no controle quanto no paciente com APECED (**Figura 12A**). Observamos o MIF (**Tabela 2**) e a expressão de Cit b_{558} mostrou-se semelhante ao controle.

Tabela 2 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de granulócitos de paciente com APECED

	Não marcado	Anti- FlavoCitocromo b_{558}
Controle	2,98	345
Paciente	3,57	298

Análise da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de granulócitos por citometria de fluxo. As células foram marcadas com Anti-Flavocitocromo b_{558} para avaliar a expressão de Flavocitocromo b_{558} por citometria de fluxo. Não observou-se diferença entre o controle e paciente com APECED.

Figura 12 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} em granulócitos e monócitos de paciente com APECED e controle sadio

Histograma da expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de granulócitos (A) e monócitos (B). As células foram marcadas com Anti-Flavocitocromo b_{558} para avaliar a expressão de Flavocitocromo b_{558} por citometria de fluxo. Não observou-se diferença entre o controle e paciente com APECED. Paciente em traço pontilhado, Controle em traço cheio.

A população de monócitos apresenta-se definida em duas populações, *high* e *low*, no controle, enquanto no paciente com APECED só há uma população, a *high*. No entanto a população *high* do paciente tem uma expressão diminuída de Flavocitocromo b_{558} quando comparada com a população *high* do controle (**Figura 12B**). Já na análise do MIF (**Tabela 3**) o paciente apresenta-se de forma semelhante ao controle.

Tabela 3 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de monócitos de paciente com APECED

	Não marcado	Anti- FlavoCitocromo b_{558}
Controle	2,98	657
Paciente	3,57	599

Análise da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de monócitos por citometria de fluxo. As células foram marcadas com Anti-Flavocitocromo b_{558} para avaliar a expressão de Flavocitocromo b_{558} por citometria de fluxo. Não observou-se diferença entre o controle e paciente com APECED.

Para a confirmação dos resultados obtidos realizamos uma nova coleta de amostra do paciente com APECED e utilizamos a marcação com Anti-CD14, um

marcador da população de monócitos. A análise da expressão de Flavocitocromo b_{558} da população CD14 positiva mostrou-se semelhante entre o controle e paciente com APECED, confirmando os resultados obtidos anteriormente (**Figura 4**).

Tabela 4 - Expressão de Flavocitocromo b_{558} da população de CD14+ de paciente com APECED

	Não marcado	Anti- FlavoCitocromo b_{558}
Controle	28,5	620
Paciente	13,3	679

Mediana da Intensidade de Fluorescência da expressão de Flavocitocromo b_{558} da população CD14 positiva por citometria de fluxo. Marcação com Anti-Flavocitocromo b_{558} e Anti-CD14. Não observou-se diferença entre o controle e paciente com APECED.

Além da análise da expressão dos componentes de membrana do sistema NADPH oxidase, vimos a expressão de *p40phox*, um componente citoplasmático deste sistema. Observamos que não há diferença na expressão desta proteína entre a população CD14 positiva do paciente com APECED e do controle sadio (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Expressão de *p40phox* da população CD14+

	Não marcado	<i>p40phox</i>
Controle	28,5	63,75
Paciente	13,3	66

Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) da expressão de *p40phox* da população CD14 positiva por citometria de fluxo. Marcação com Anti-*p40phox* e Anti-CD14. Não observou-se diferença entre o controle e paciente com APECED.

Na **Figura 13** observamos o histograma da população de Granulócitos no ensaio de DHR. É possível notar que não há diferenças entre o não estimulado e os estimulados (PMA, CURDLAN e Zymosan Depletado). Quando analisamos a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) (**Tabela 6**) encontramos que os agonistas de dectina-1 (CURDLAN e Zymosan Depletado) mostraram não estimular de forma eficiente a via do “*burst oxidativo*”, pois não há diferença em relação ao não estimulado.

Figura 13 - Ensaio DHR nos granulócitos de paciente com APECED

Os granulócitos do controle e paciente com APECED foram estimuladas com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência. Não houve diferença entre o paciente com APECED e o controle. NE=não estimulado; PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1. Paciente em traço pontilhado, Controle sadio em traço cheio.

Tabela 6 - Ensaio DHR da população de granulócitos de controle e paciente com APECED

	Não estimulado	PMA	CURDLAN	Zymosan Depletado
Controle	43	3491	38,8	35,9
Paciente	37,4	3150	31,7	31,9

Os granulócitos do controle e paciente com APECED foram estimulados com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” de hidrogênio por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1.

No mesmo experimento observamos o histograma da população de monócitos (**Figura 14**). Podemos verificar que os monócitos do indivíduo controle mostraram mais de uma pico de fluorescência dentro da população, o que indica que há populações com atividade de “*burst oxidativo*” diferentes. Mesmo com o controle possuindo diferentes níveis produção de peróxido de hidrogênio o paciente com APECED mostrou produzir menos H₂O₂. O MIF (**Tabela 7**) também mostrou que o paciente com APECED tem menor atividade “*burst oxidativo*” o controle, mas há uma maior “*burst oxidativo*” nas células estimuladas com o PMA, quando comparado com os estímulos agonistas de Dectina-1.

Figura 14 - Ensaio DHR na população de monócitos do paciente com APECED

Os monócitos do controle e paciente com APECED foram estimuladas com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” por citometria de fluxo. Os resultados expressão a mediana da intensidade de fluorescência. Observa-se uma menor atividade de “*burst oxidativo*” no paciente quando comparado ao controle. NE=não estimulado; PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado= agostistas de Dectina-1. Paciente em traço pontilhado, Controle sadio em traço cheio.

Tabela 7 - Ensaio DHR da população de monócitos de paciente com APECED e controle sadio

	Não estimulado	PMA	CURDLAN	Zymosan Depletado
Controle	129	217	126	79
Paciente	76,3	127	67,8	70,6

Os monócitos do controle e paciente com APECED foram estimuladas com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1.

Para a confirmação dos resultados obtidos na análise da produção de peróxido de hidrogênio na primeira fase de testes com as células do paciente com APECED, foi realizado um novo ensaio DHR associado a uma marcação com anticorpo anti-CD14. Como não observamos diferença entre o controle e o paciente com APECED após 30 min de estímulo, nós estimulamos por 60 min para analisar o perfil de resposta em um tempo prolongado. Observamos que a população CD14 positiva do paciente com APECED possui um “*burst oxidativo*” 34% menor quando estimulada com Curdlan e 21% menor quando estimulada com Zymosan depletado

comparado ao controle sadio (**Figura 15 e Tabela 8**).

Tabela 8 - Ensaio DHR da população CD14+ de paciente com APECED e controle sadio

	Não estimulado	PMA	Curdlan	Zymosan depletado
Controle	102,4	157	138	114,8
Paciente	91,05	140	89,9	89,4

A população CD14 positiva do controle e paciente com APECED foi estimulada com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 1h. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). PMA=phorbol myristate-acetate; Curdlan e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1.

Figura 15 - Ensaio DHR da população CD14+ de paciente com APECED e controle sadio

A população CD14 positiva do controle e paciente com APECED foi estimulada com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 1h. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “*burst oxidativo*” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF). PMA=phorbol myristate-acetate; Curdlan e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1. Paciente em traço pontilhado, Controle sadio em traço cheio.

Da mesma maneira a população CD14 negativa do paciente com APECED tem um “*burst oxidativo*” 13% menor quando estimulado com Curdlan e 23% menor quando estimulado com Zymosan depletado comparado ao controle sadio (**Tabela 9**). Estes resultados associados ao resultados obtidos com a análise da população CD14 positiva sugerem a necessidade de um tempo de contato maior para observar uma diferença no “*burst oxidativo*” entre o controle sadio e o paciente com APECED.

Tabela 9 - Ensaio DHR da população CD14- de paciente com APECED e controle sadio

	Não estimulado	PMA	Curdlan	Zymosan depletado
Controle	38,8	522	46,55	31,75
Paciente	26,85	1031	40,3	24,4

A população CD14 negativa do controle e paciente com APECED foi estimulada com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 1h. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “burst oxidativo” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média de intensidade de fluorescência (MIF). PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1.

Figura 16 - Ensaio DHR da população CD14- de paciente com APECED e controle sadio

A população CD14 negativa do controle e paciente com APECED foi estimulada com PMA (90nM), CURDLAN (100 µg/mL) Zymosan depletado (100 µg/mL) durante 30min. Após tratamento, as células foram marcadas com dihidro-rodamina para avaliação do “burst oxidativo” por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média de intensidade de fluorescência (MIF). PMA=phorbol myristate-acetate; CURDLAN e Zymosan depletado=agostistas de Dectina-1. Paciente em traço pontilhado, Controle sadio em traço cheio.

Analizamos também a capacidade fagocítica do paciente com APECED. Observamos que o paciente com APECED fagocita 33% menos que o controle sadio (Tabela 10).

Tabela 10 - Índice fagocítico do paciente com APECED e controle sadio

<i>C. albicans</i>	
fagocitas	
Controle	482
Paciente	321

Os PBMCs foram incubados com *C.albicans* por 1h (MOI 1:1). Para análise do índice de fagocitose foi realizada a contagem de 100 células por microscopia de luz em lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Observou-se que o paciente com APECED fagocitam 33% menos que o controle sadio. Experimento realizado em duplicata.

5 DISCUSSÃO

Mutações no gene *AIRE* levam ao desenvolvimento da síndrome Poliendocrinopatia Autoimune Associada a Candidíase e Distrofia Ectodérmica (APECED). Esta síndrome é caracterizada pela presença de auto-anticorpos específicos para vários antígenos próprios e seu diagnóstico clínico é definido pela associação de dois dos três principais sintomas da doença: hipoparatireoidismo, doenças de Addison e suscetibilidade a infecções por *C. albicans* (Bjorses, 2000; Weiler et al., 2012).

Nos pacientes deficientes de AIRE, as infecções causadas por *C. albicans* podem ser explicadas, em parte, pela presença de anticorpos contra IL-17 ou receptores de IL-17. Contudo, alguns pacientes não produzem estes auto-anticorpos e, mesmo assim, têm suscetibilidade a este fungo. Estes pacientes, também possuem um defeito na diferenciação de células Th17 independente de auto-anticorpos, sugerindo uma falha nas células apresentadoras de antígeno (Ng et al., 2010).

Nosso grupo demonstrou que AIRE possui uma atividade extra-nuclear relacionada a ativação da via do receptor Dectina-1. Observamos que pacientes com APECED apresentam defeitos na resposta a β -glucano pela via Dectina-1, confirmado em células THP-1 silenciadas para AIRE (Pedroza et al., 2011). Assim, acumulamos evidências que suportam a hipótese de que a suscetibilidade a infecções por *C. albicans* em pacientes APECED ocorre por uma falha na ativação do receptor Dectina-1, gerando uma resposta ineficaz.

No presente estudo, investigamos como a ausência de AIRE ou sua redução expressiva influencia em eventos específicos para o reconhecimento e eliminação do patógeno via receptor Dectina-1, utilizando células THP-1 silenciadas para a proteína AIRE e paciente com APECED. Investigamos se a proteína AIRE seria importante para a produção de ROS e na atividade fagocítica.

Inicialmente analisamos a produção de ânion superóxido por redução de citocromo c. Observamos que as células THP-1 tratadas com IFN- γ e TNF- α produziram baixas quantidades de superóxido (**Figura 2**). Desta forma, não foi possível observar diferença entre as condições de estímulo. Sabemos que células de linhagem têm produção de ânion superóxido diminuída, quando comparado a neutrófilos e monócitos de indivíduos saudáveis (Almeida et al., 2005). Assim, buscamos outra técnica para avaliar a atividade do sistema NADPH oxidase.

Desta forma, utilizamos o ensaio DHR, que envolve reação com o peróxido

de hidrogênio, como outro método de avaliação do “*burst oxidativo*”. Não observamos diferença no “*burst oxidativo*” entre as células THP-1 silenciadas para AIRE e células THP-1 *wild-type* (**Figura 4 e 5**). Estudos demonstraram que doses crescentes de LPS ou Zymosan para a dosagem de ROS nas células THP-1 tratadas por 48 horas com 5ng/mL de PMA não mostraram diferença entre as diferentes condições (Ramery, O'Brien, 2011). Estes dados corroboram juntamente com a análise do “*burst oxidativo*”, que as células THP-1 não são o modelo ideal para realizar a dosagem de ROS por possuírem um “*burst oxidativo*” diminuído em um modelo de silenciamento *knockdown*.

Na investigação da expressão dos componentes do sistema NADPH oxidase, não observamos uma diferença de expressão das proteínas entre as células WT e KD tratadas ou não com IFN- γ e TNF- α (**Figura 6, 7, 8 e 9**). Esses dados sugerem que como não há comprometimento dos componentes do sistema NADPH, possivelmente o defeito estaria no reconhecimento do receptor dectina-1.

Na análise do índice de fagocitose de *C. albicans*, observamos que as células silenciadas para AIRE fagocitam menos que as células *wild-type* (**Figura 10**). Estes dados corroboram com os dados obtidos por Brännström e colaboradores (2007) que mostraram que monócitos de pacientes com APECED possuem um atraso na internalização de zymosan, além de fagocitarem menos comparado a controles sadios (Brännström et al., 2007).

A APECED é uma doença rara com 500 pacientes relatados em todo o mundo, aproximadamente (Weiler et al, 2012). Não existem publicações sobre a prevalência da APECED no Brasil. A paciente, encaminhada pelo grupo da Dra. Marize Lazaretti Castro, possui 28 anos e nasceu de pais consanguíneos. O primeiro sintoma apareceu aos 5 anos de idade como candidíase ungueal, aos 20 anos observou-se hipoparatiroidismo e posteriormente foi observado insuficiência adrenal subclínica (Weiler et al., 2012). A amostra do paciente com APECED e indivíduo controle foram utilizadas para a análise da expressão de componentes do sistema NADPH oxidase e da produção de ROS.

Inicialmente, analisamos a expressão de componentes do sistema NADPH oxidase nas células de paciente com APECED e indivíduo controle. Podemos observar que não há diferença na expressão de citocromo b_{558} entre os granulócitos e monócitos do paciente e controle sadio (**Figura 12, Tabela 2 e 3**). Em outro experimento confirmamos os resultados quando analisamos a população CD14

positiva e não observamos diferença na expressão de citocromo b_{558} e também de *gp40phox* do paciente e do controle. Esses dados corroboram com os resultados obtidos com as células THP-1 KD, sugerindo que AIRE não tem influência nos componentes do sistema NADPH.

O próximo passo foi analisar a produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que o nível de expressão de moléculas do sistema NADPH apresentava-se semelhante nas populações de granulócitos e monócitos de paciente e controle.

A produção de H_2O_2 pela população de granulócitos e monócitos do paciente mostrou-se semelhante ao indivíduo controle com 30min de estimulação (**Figura 13 e 14 e Tabela 6 e 7**). Repetimos este ensaio com 1h de estímulo e vimos que o paciente com APECED tem um “*burst oxidativo*” menor comparado ao controle tanto na população CD14 positiva quanto na população CD14 negativa (**Tabela 8 e 9**). Estes dados corroboram com a literatura uma vez que sabemos que o receptor dectina-1 é receptor primário para β -glucano de fungos (Marakalala et al., 2010) e a ativação por β -glucano leva produção de ROS (Donine et al., 2007). Além disso estudo mostraram que a ativação de dectina-1 em monócitos induz ativação de CD18 e leva a produção de ROS nos neutrófilos (Li et al., 2011). Assim, uma vez que a ativação de dectina-1 está diminuída, haverá diminuição na resposta do neutrófilos ao β -glucano.

Na análise do índice de fagocitose de *C. albicans*, observamos que os PBMCs do paciente com APECED fagocitam menos comparado ao controle sadio. Estes resultados corroboram com os obtidos com as células THP-1 silenciadas para AIRE, confirmando que as células do paciente com APECED teriam um defeito na fagocitose de *C. albicans*.

Até pouco tempo acreditava-se que a suscetibilidade a candidíase nos pacientes com APECED era pela produção de auto-anticorpos contra IL-17 ou receptores IL-17. No entanto, alguns pacientes não apresentam tais auto-anticorpos e são susceptíveis a *C. albicans* (Ng et al., 2010).

Como um todos, nossos resultados encontrados com a análise da fagocitose com células THP-1 silenciadas para AIRE e com PBMC do paciente com APECED associados aos dados obtidos com a análise do “*burst oxidativo*” no paciente sugerem que há um defeito no reconhecimento do patógeno via Dectina-1, o que pode explicar o atraso na fagocitose de *C. albicans* e produção de ROS após um tempo prolongado de estímulo. Estes achados podem explicar um provável

mecanismo de como a *C. albicans* sobrevive, causando infecções crônicas e/ou recorrentes nestes pacientes.

6 CONCLUSÕES

As células THP-1 silenciadas para AIRE possuem um “*burst* oxidativo” semelhante ao das células THP-1 *wild-type*.

A proteína AIRE não tem influencia na expressão dos componentes do sistema NADPH oxidase tanto nas células THP-1 silenciadas para AIRE quanto nas células do paciente com APECED.

As populações de monócitos CD14 positiva e CD14 negativa possuem uma diminuição na produção no “burst oxidativo” quando estimuladas por um tempo prolongado, o que sugere que há um defeito no reconhecimento via dectina-1.

As células THP-1 silenciadas para AIRE e as células do paciente com APECED possuem uma diminuição na fagocitose de *C. albicans*.

REFERÊNCIAS*

- Abdalla MY. NADPH oxidase, the macrophage killing weapon. *Free Radial and Radiation Biol Prog.* 2001;1:11.
- Almeida AC, Rehder J, Severino SD, et al. The effect of IFN- γ and TNF- α on the NADPH oxidase system of human colostrum macrophages, blood monocytes, and THP-1 cells. *J Interferon and Cytokine Res.* 2005;25:540-6.
- Brännström J, Hassler S, Peltonen L, et al. Defect internalization and tyrosine kinase activation in Aire deficient antigen presenting cells exposed to *Candida albicans* antigens. *Clin Immunol.* 2006;121(3):265-73.
- Bjorkman L, Dahlgren C, Karlsson A, et al. Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease. *Arthritis Rheuma.* 2008;58(10):2931-5.
- Björres P, Halonen M, Palvimo JJ, et al. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet.* 2000;66(2):378-92.
- Bokoch GM. Chemoattractant signalling and leukocyte activation. *Blood.* 1995;86:1649-60.
- Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 2001;99:7-17.
- Chaffin WLJ, López-Ribot JL, Casanova M, et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol and Mol Biol Rev.* 1998;62(1):130-80.
- Chiurchiu V, Maccarrone M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(9):2605-41.
- Colonna M. All roads lead to CARD9. *Nat Immunol.* 2007;8(6):554-5.
- Condino-Neto A, Whitney C; Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol.* 1998;161(9):4960-7.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Dang PM, Cross AR, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67phox and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:3001–5.

Destin KG, Linden JR, Laforce-Nesbitt SS, et al. Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Early Hum Dev*. 2009;85(8):531-5.

Donine M, Zenaro E, Tamassia N, et al. NADPH oxidase of human dendritic cells: Role in *Candida albicans* killin and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur J Immunol*. 2007;37:194-1203.

El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA, et al. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*. 2009;41(3):217-25.

Ferwerda G, Netea MG, Joosten LA, et al. The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. *Vaccine*. 2010;28(3):614-22.

Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol: Mechanisms of Disease*. 2011;7:61-8.

Filler SG. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin in Microbiol*. 2006;9:333-9.

Goodridge HS, Underhill DM, Touret N. Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic*. 2012;13(8):1062-71.

Gray D, Abramson J, Benoist C, et al. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med*. 2007;204(11):2521-8. Epub 2007 Oct 1.

Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin in Microbiol*. 2012;15:1-7.

Gringhuis SI, Dunnen JD, Litjens M, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol*. 2009;10(2):203-13.

Hanna S, Etzoni A. New host defense mechanisms against *Candida* species clarify the basis of clinical phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(6):1433-7.

Hong M, Ryan KR, Arkwright PD, et al. Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):40-51

Karavits J, Kovacs EJ. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol*. 2011;90(6):1065-78.

Kisand K, Peterson P. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy: known and novel aspects of the syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1246:77-91.

Kotsias F, Hofmann E, Amigorena S, et al. ROS production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid Redox signal.* 2013;18(6):714-29.

Leusen JHW, Verhoeven AJ, Ross D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues on the phox Family. *Front Biosci.* 1996;1:d72-90.

Li X, Utomo A, Cullere X, et al. The β -glucan receptor dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell Host Microbe.* 2011;10:603-15.

Mauch L, Lun A, O'Gorman MR, et al. Chronic Granulomatous Disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem.* 2007;53(5):890-6.

Marakalala MJ, Kerrigan AM, Brown GD. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. *Mamm Genome.* 2010;22(1-2):55-65

Mathis D, Benoist C. *Aire.* *Annu Rev Immunol.* 2009;27:287-312.

Moyes DL, Naglik JR. Mucosal Immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:346307.

Ng WFMRC, Delwig AMD, Carmichael AJ, et al. Impaired Th17 responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with and without autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):1006-15.

Netea MG, Maródi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol.* 2010;31:346-53.

Pedroza LA, Kumar VMS, Sanborn KB, et al. Autoimmune regulator (AIRE) contributes to Dectin-1-induced TNF- α production and complexes with caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9), spleen tyrosine kinase (Syk), and Dectin-1. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;129(2):464-72.

Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Schmidt S, et al. Phagocytosis, oxidative burst, and killing of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by human neutrophils. *Microbiol Lett.* 2000;191(200):151-5.

Peterson P, Org T, Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:948-57.

Plevin MJ, Mills MM, Ikura M. The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(2):66-9.

Pereira LE, Bostik P, Ansari AA. The development of mouse APECED models provides new insight into the role of AIRE in immune regulation. *Clin Dev Immunol.* 2005;12(3):211-6.

Ramery E, O'Brien PJ. Evaluation the cytotoxicity of organic dust components on THP-1 monocytes-derived macrophages using high content analysis. *Environmental Toxicology.* 2012. Epub ahead of print.

Reid DM, Gow NAR, Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):30-7.

Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, et al. Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED. *Clin and Exp Immunol.* 2008;154:406-14.

Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. Immunohistochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88(6):250-65.

Skrzypek F, Cenci E, Pietrella D, et al. Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to *Candida albicans* through MyD88 activation. *Microbes Infect.* 2009;11(6-7):661-70.

Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, et al. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med.* 2004;199(2):167-72.

Weiler FG, Dias-Da-Silva MR, Lazaretti-Castro M. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: case report and review of literature. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(1):54-66.

Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(6):642-60.

Xie J. The C-type lectin-like receptors of dectin-1 cluster in natural killer gene complex. *Glycoconj J.* 2012;29(5-6):273-84.