Daniel Valério Da Silva Moreira

Vias de ativação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose: papel de receptores de reconhecimento de padrões (PRRS) e implicações no tratamento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2019

Daniel Valério da Silva Moreira

Vias de ativação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose: papel de receptores de reconhecimento de padrões (PRRS) e implicações no tratamento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Daniel Valério da Silva
Vias de ativação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose : papel de receptores de reconhecimento de padrões (PRRS) e implicações no tratamento / Daniel Valério da Silva Moreira. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Sandro Rogério de Almeida.

Descritores: 1.Paracoccidioides 2.Paracoccidioidomicose 3.Receptores de reconhecimento de padrão 4.Padrões moleculares associados a patógenos 5.Caspase 1 6.Interleucina-1beta

USP/FM/DBD-132/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A minha família que me ajudo a chegar onde estou e ao meu eterno meninão, que sempre foi o motivo de tudo.

AGRADECIMETOS

Ao meu Orientador Profº. Dr. Sandro Rogerio de Almeida, pela oportunidade de realizar um sonho, por toda paciência, confiança, ensinamento e por incentivar sempre a buscar mais conhecimento

A Dra. Adriana Satie Gonçalves Kono, pelo tempo memorável no ambulatório de micoses da MI, por todos os conselhos tanto profissionais como do dia a dia, e pela ajuda durante o período do trabalho discutindo casos dos pacientes e por todo aprendizado e oportunidade que me proporcionou.

Ao Profº. Dr. Gil Benard, pelo tempo em conjunto no ambulatório de micoses, pela ajuda com a captação e discussão dos casos de pacientes, por todo apoio ao projeto e por sempre estar disposto a discutir e ensinar sobre a doença.

Aos Residentes do Departamento de moléstias infecciosas e parasitárias que acompanharam durante o projeto e também me auxiliaram nas entrevistas e captação dos pacientes e por todo o conhecimento compartilhado durante nossas discussões no ambulatório

As enfermeiras do ambulatório de micoses, que sempre se mostraram solicitas e ajudaram sempre com prontuários e triagem dos pacientes, em especial a Marisa por sempre estar disponível para realizar as coletas de sangue dos pacientes, e a Dona Dalva por auxiliar com a triagem e prontuário dos pacientes

A todos os funcionários do ambulatório de micoses que transformaram esse tempo em um momento ímpar de aprendizado e novas experiências.

Ao todos os amigos do laboratório de micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Zé, Grasi, Leandro, Lari, Lavinia, Luana, Fábio, Suelen, Mirian, Gabriela, Camila, e o último a subir no barco Murilo, por compartilharem todos os momentos de angustias e risadas (graças a Deus não foram poucas) por sempre auxiliarem com experimentos e conhecimento e compartilharem o Dia a Dia.

À Renata Alves Albuquerque a melhor técnica de todas, por toda ajuda com materiais, experimentos, e sempre a disposta ajudar, obrigado por me ajuda a organizar tudo sempre e por apoiar nos momentos difíceis.

A Profª. Dra Marta Heloisa Lopes chefe do LIM-48, por apoiar e ceder o espaço do Laboratório para a realização de experimentos

A Profª Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, por todo o apoio e incentivo desde os primeiros contatos com a micologia e por me incentivar a buscar sempre mais e melhor.

Aos meus colegas do LIM-48 Sheila, Carol, Constância, Felipe, Flavinha, Paula, Celinha, E. Shimoda, Claudia, Marcia Andrea, onde tudo começou, pelo apoio em todos os momentos foram alguns anos juntos antes de iniciar essa caminhada e compartilhamos muitas e boas lembranças.

A Vivian Caso Coelho, minha parceira e minha irmãzinha desde a época da faculdade e hoje minha companheira de Pós-Graduação, pelo apoio incondicional sempre, desde o início no LIM-48 até hoje.

A Gabriela Rodrigues e Fonseca por todo o apoio e ajuda nos bons e maus momentos, por todas as conversas nos banquinhos do IMT você foi muito importante.

Aos colegas do LIM-53, Dra. Gilda Del Negro, Danilo, Gabriel, Fernanda, Lumena, Dra. Monica Vidal, Dra. Maria da Gloria, pela parceria e apoio, compartilhando disciplinas, cursos e aprendizado, D. Antônia a minha "Veia" por todos os momentos especiais de risadas e apoio principalmente nos dias difíceis e em especial a Dra. Viviane Gimenez pelo apoio e auxilio na manutenção das cepas de Pb18.

A CAPES e FAPESP pela ajuda e apoio financeiro

A todos os amigos que fizeram parte dessa caminhada, apoiando e incentivando a cada momento, em especial ao Marcelo Petry que nos últimos dias dessa caminhada me ajudou muito com nossas discussões (apesar de todos pensarem que estávamos brigando), a manter o foco e chegar ao final.

Ao Sr. Marcos Antônio Boen e Sra. Helena Silveira Boen por me acompanharem e incentivarem durante todo o processo e principalmente por me acolherem em casa nos últimos tempos do mestrado auxiliando para que fosse possível chegar aqui.

A Laís Boen meu amor, minha parceira de vida, parte essencial também dessa conquista, por me aturar durante todo o processo (sei que não foi fácil), com todas os estresses, medos e receios sempre foi a primeira a me ajudar a levantar e seguir (eu te amo "muie")

A minha Família em especial meu Tio Oscar por todo apoio que sempre me deu.

Aos meu Pais e meu irmão, sem vocês nada disso seria possível, por todo sacrifício que fizeram para que pudesse fazer o mestrado, eu amo vocês.

Ao José Valério da Silva *in memoriam*, meu eterno meninão, que sempre me incentivou e me levou a estudar, eu sei que sempre me acompanha em tudo e sempre é uma inspiração.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1. *INTRODUÇÃO* 1

1.1 Paracoccidioidomicose e paracoccidioides brasiliensis 1

1.2 Resposta imune nas micoses 6

1.3. Inflamassomos e nlrs 9

1.4. Toll-like receptor - tlrs 12

1.5. Dectina-1 15

2. OBJETIVOS 18

2.1 Objetivo geral 18

2.2 Objetivos específicos 18

3. MATERIAL E MÉTODOS 19

3.1 Fungo e cultivo: 19

3.2. Preparação do inóculo do pb18 19

3.3. Amostra clínica 19

3.4. Critério de inclusão 20

3.4.1. Seleção dos pacientes 20

3.4.2. Seleção dos controles 20

3.5. Critérios de exclusão 20

3.6. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico de pacientes 21

3.7. Análise da expressão de prrs e nods em células mononucleares de pacientes e controles 21

3.7.1. Extração de rna total 21

3.7.2. Gel de desnaturante 22

3.7.3. Quantificação do rna total 22

3.7.4. Pureza do rna total 22

3.7.5. Tratamento de rna com dnase 23

3.7.6. Síntese de cdna 23
3.7.7. PCR em tempo real 23

3.8. Avaliação da participação dos prrs na produção de citocinas e indução da resposta imune adptativa **24**
3.8.1. Dosagem de citocinas (elisa) 25

3.9. Análise estatística **25**

4. Resultados 26

4.1 Análise do perfil de citocinas 26
4.1.1. IL-1B 26
4.1.2. TNF-A 29

4.2. Análise de expressão gênica 32
4.2.1. Expressao genica relativa de caspase 1 33
4.2.2. Expressao genica relativa de caspase 8 36

5. Discussão 40

6. Conclusão 44

7. Referências bibliograficas 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes aspectos morfológicos apresentados por *P. brasiliensis.* 2
Figura 2 Possíveis sequelas encontradas em pacientes com PCM 3
Figura 3: Esquematização de possíveis meios de contagio, fatores de risco e possíveis hospedeiros 4
Figura 4 Drosófila morta com infecção por A. fumigatus..... 13
Figura 5 Diagrama esquemático de TLRs 14
Figura 6: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e índividuos controle na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 27
Figura 7: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controle na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. 28
Figura 8: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. 29
Figura 9: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM ou Indivíduos controles na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. 30
Figura 10: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. 31
Figura 11: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controle na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. 32
Figura 12: Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e Indivíduos controles, após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas..... 34
Figura 13 Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. 35

Figura 14 Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controle após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. 36
Figura 15 Análise transcricional de caspase 8 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e Indivíduos controles, após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas 37
Figura 16 Análise transcricional de caspase 8 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. 38
Figura 17 Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controle após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. 39

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Tabela descritiva de pacientes inseridos no estudo.....20
Tabela 2: Sequência de Primers utilizados nos ensaios de qRT-PCR.....24

LISTA DE ABREVIATURA

ASC – Proteina Adaptadora de CARD

A. fumigattus **-** Aspergillus fumigatus

BSA - Albumina sérica bovina

Card9 - Caspase recruitment domain-containing protein 9

C. albicans **-** Cândida albicans

C. neoformans **-** Cryptococcus neoformans

CARD - Domínio de ativação e recrutamento de caspases

CASP-1 - Caspase1

CASP- 8 Caspase-8

cDNA - Ácido desoxirribonucléico fita complementar

CLR - C-type lectin receptors

Ct - Threshold

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Óptica

ELISA - Ebsyme-linked immunosorbent assay

ID - Imunodifusão dupla

IL-1β - Interleucina 1β

IL-12 - Interleucina 12

IL-18 - Interleucina 18

LPS - Lipopolissacarídeo

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MyD88 - Myeloid differentiation primary response gene (88)

NF-kB - Nuclear factor-kappa B

NLRP3 - Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD

NOD - Nod-like receptors

PAMP - Pathogen-associated molecular patters

Pb - Paracoccidioides brasiliensis

Pb18 - Paracoccidioides brasiliensis isolado 18

P. brasiliensis - Paracoccidioides brasiliensis

P. Lutzii - Paracoccidioides lutzii

PBS - Solução salina em tampão fosfato

PCM - Paracoccidioidomicose

PCR - Polymerase Chain Reaction

PRR - Pattern recognition receptor

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR - Real Time of Polymerase Chain Reaction

SFB - Soro fetal bovino

RNA - Ácido ribonucléico

TA - Temperatura ambiente

Th1 - Linfócitos T helper classe 1

Th2 - Linfócitos T "helper" classe 2

Th17 - Linfócitos T helper classe 17

TLR - Toll-like receptor

TLR2 - Toll-like receptor 2

TLR4 - Toll-like receptor 4

TLR7 - Toll-like receptor 7

TLR9 - Toll-like receptor 9

TNF-α Tumor necrosis factor α

TRIF - TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

RESUMO

Moreira DVS. *Vias de ativação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose*: papel de receptores de reconhecimento de padrões (PRRS) e implicações no tratamento [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa, sistêmica de natureza profunda que afeta o tecido pulmonar podendo disseminar via linfo-hematogênica para outros órgãos e tecidos, sendo causada por fungo dimorfico do gênero *Paracoccidioides sp*. Receptores de reconhecimento padrão como NLRs, TOLLs e Lectinas do tipo C, são elementos da resposta imune inata relacionadas à sondagem do ambiente intra e extracelular, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos ou a dano ao hospedeiro. Após interação, os receptores podem ativar os inflamassomas, plataformas multiprotéicas envolvidas na ativação da caspase-1 e, subsequentemente, das citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e IL-18. A atividade dos Receptores de reconhecimento padrão/ Inflamassomas foi vinculada a diversos processos fisiopatológicos, como diabetes, obesidade e doenças infecciosas (bacterianas, virais e fúngicas). Assim, cresce cada vez mais a importância de estudos que evidenciam a modulação da resposta imune mediada por Receptores de reconhecimento padrão, como os inflamassoma, TLRs e a Lectinas do tipo C e compreendendo suas relações com uma resposta protetora as infecções fúngicas. Ao interagir, células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos controles, na presença ou ausência de leveduras de *Paracoccidioides brasilensis* e agonistas de receptores de reconhecimento padrão, observamos uma alta produção de interleucina-1β (IL1-β) em pacientes com PCM Na presença do fungo, não sendo possível alterar essa produção quando as células foram incubadas com fungo e agonistas. Nas análises de expressão gênica dos Receptores de reconhecimento padrão observamos um–aumento na expressão gênica de caspase-1 e caspase-8 principalmente em células de pacientes com PCM quando estimulamos com agonista de Lectina do tipo C. Estudos recentes em paracoccidioidomicose murina demonstraram que o mesmo fenômeno encontrado em nosso estudo se mostrou protetor contra a doença. Em nosso estudo fomos capazes de modular a resposta imune das células dos pacientes com PCM e indivíduos controle utilizando agonista de PRR

auxiliando em estudos de novos alvos e possíveis abordagens terapêuticas.
Descritores: *Paracoccidioides*; Paracoccidioidomicose; Receptores de reconhecimento de padrão; Padrões moleculares associados a patógenos; Caspase-1; Interleucina-1beta.

ABSTRACT

Moreira, DVS. *Pathways of activation of peripheral blood mononuclear cells of patients with paracoccidioidomycosis*: role of pattern recognition receptors (PRRS) and treatment implications (Dissertation). "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo". 2019.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease, that affects lung tissue and can disseminate via lymphohematogenic to other organs and tissues, being caused by a dimorphic fungus of the genus *Paracoccidioides sp*.. Pattern recognition receptors such as NLRs, TOLLs and Type C Lectins, are elements of the innate immune response related to intra and extracellular environment probing, recognizing pathogen-associated molecular patterns or host damage. When activated, the receptors may form inflammasome, multiprotein platforms involved in the activation of caspase-1 and, subsequently, proinflammatory cytokines such as IL-1β and IL-18. The activity of Pattern recognition receptors/ Inflammasomes was associated with several pathophysiological processes, such as diabetes, obesity and infectious diseases (bacterial, viral and fungal). Thus, the importance of studies demonstrating the modulation of the Pattern recognition receptors mediated immune response, such as inflammassoma, TLRs and Type C Lectins, and understanding their relationship to a protective response to fungal infections are increasingly promoted. When interacting, peripheral blood mononuclear cells of PCM patients and control patients in the presence or absence of yeasts of *Paracoccidioides brasilensis* and Pattern recognition receptors agonists we observed a high production of interleukin-1β in patients with PCM reaching a "cell depletion" state, failing to modulate the production of cytokines when compared to controls, where it was possible to see the modulation of cytokine production. The analyzes of Pattern recognition receptors gene expression we observed a synergistic action between caspase-1 and caspase-8 mainly in cells of PCM patients when stimulated with type C lectin agonist. Recent studies in murine paracoccidioidomycosis have shown that the same synergism found in our study was shown to be protective against the disease. In our study, we were able to modulate the immune response of the cells of patients with PCM using a Pattern recognition receptors agonist assisting in studies of new therapeutic target and possible alternative therapeutic approaches.

Descriptors: *Paracoccidioides*, Paracoccidioidomycosis, Pattern Recognition Receptors, Molecular patterns associated with pathogens, caspase-1, Interleukin-1beta.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE E PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de natureza profunda que afeta primariamente o tecido pulmonar podendo disseminar via linfo-hematogênica para outros órgãos e tecidos causando uma infecção crônica e aguda. É uma micose sistêmica endêmica em diferentes regiões do Brasil e do continente americano, causada por um complexo de espécies *P. brasiliensis* que compreende quatro linhagens filogenéticas distintas (S1/*P. brasiliensis* PS2/*P. americana*, PS3/ *P. restrepiensis*, PS4/ *P. venezuelensis,)* e pelo Pb01-like designado de *Paracoccidioides lutzi* (Matute et. al. 2006, Matute & Mcewen, 2016, Teixeira et. al., 2014 Carrero et. al. 2008, Theodoro et. al. 2012, Teixeira et. al. 2009). Foi descrita inicialmente em 1908, na cidade de São Paulo no Brasil, por Adolf Lutz (1855-1940), o qual publicou suas observações na revista “Brasil Médico”, afirmando ter obtido o cultivo do parasita, a partir de lesões ocorridas em indivíduos infectados. Após a descoberta da doença, iniciaram-se inúmeros registros de casos e tentativas de isolamento do fungo para a sua caracterização (Lacaz, 1994).

Esse fungo exibe dimorfismo térmico, encontrado na forma de micélio, à temperatura ambiente, habitando o solo de áreas endêmicas (Figura 1A e 1C) (Marques, 2003; Theodoro, 2005). Sob temperatura de 35-37ºC assume a forma de levedura, podendo parasitar o tecido hospedeiro, caracterizada por sua forma oval ou esférica. Essas células são multinucleadas e multiplica-se por brotamentos laterais, o que resulta em uma estrutura com aparência de leme, a qual é a principal característica taxonômica e de diagnóstico desse fungo (figura 1B e 1D). Adolf Lutz (1908) e Splendore (1912) foram os primeiros a relatar essa micose e observar o dimorfismo térmico desse fungo, respectivamente.

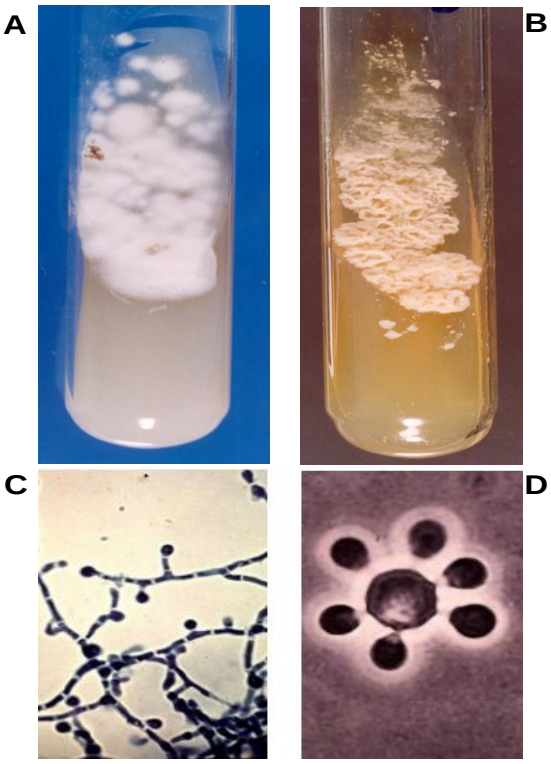

Figura 1: Diferentes aspectos morfológicos apresentados por *P. brasiliensis.* Observamos uma cultura clara aderente de aspecto cotonoso e hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas com produção de clamidósporos terminais ou intercalares respectivamente em A e C, observa-se em B e D colônias de coloração creme, chamadas cerebriformes, presença de células arredondadas ou ovais, multinucleadas, com paredes celulares espessos, birrefringentes, rodeadas por multibrotamentos, constituindo a aparência de leme

A PCM causa significante impacto socioeconômico nos países latino-americanos, pois afeta trabalhadores rurais no período produtivo da vida (DEL NEGRO et al., 2000). Indivíduos que exercem atividades agrícolas constituem a maior fração dos pacientes com a micose ativa, mas a infecção, que aparentemente era rural, também atinge zonas urbanas, especialmente nas rotas usadas por trabalhadores migrantes entre zona rural e urbana. Assim, pode atingir todas as profissões, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros (LACAZ, 1991; RESTREPO, 1985; McEWEN, et al., 1995). O tratamento é geralmente longo e difícil, sendo necessária hospitalização dos pacientes em alguns casos, além de ser considerado de alto custo.

Sequelas também são comuns, causando frequentemente disfunção pulmonar, sérias deformações dermatológicas e outras disfunções (Figura 2) (FRANCO et al., 1994). A importância da PCM na saúde pública deve-se aos custos sociais e econômicos decorrentes não apenas da doença em atividade, que afeta indivíduos em fase produtiva, como também das frequentes sequelas secundárias a essa micose, sendo em alguns,

motivo de incapacitação para o trabalho. Os trabalhadores rurais são os mais atingidos, principalmente aqueles que trabalham com atividades relacionadas ao solo e à agricultura. (Restrepo, 1985 Conti-Diaz et al., 1989; Shikanai-Yasuda et al., 2006, Wanke & aidê, 2009, Shikanai-Yasuda et. al. 2017).

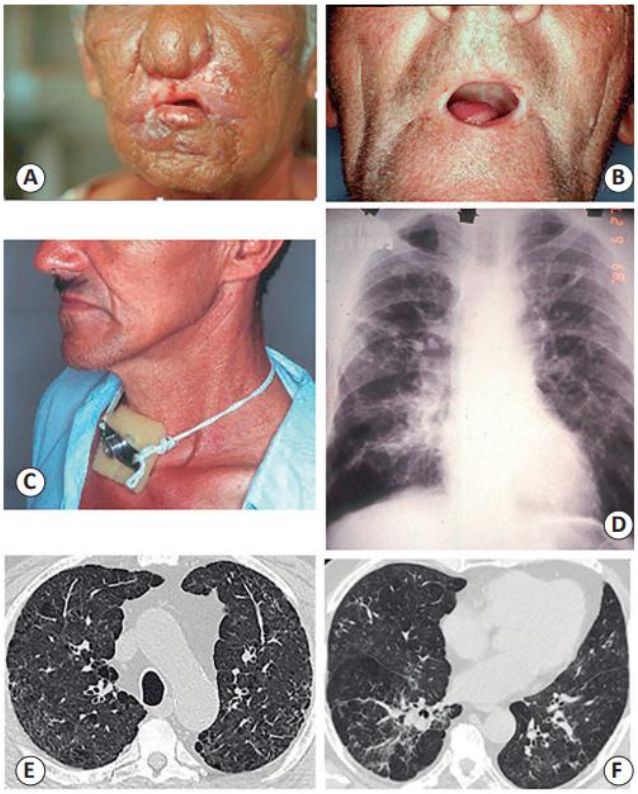

Figura 2 Possíveis sequelas encontradas em pacientes com PCM. Em A e B observamos microstomia resultante de lesões periorais, em C. Traqueostomia como resultado de estenose traqueal, D. Radiografia de tórax mostrando infiltrado reticular bilateral residual, E e F. tomografia mostrando espessamento septal pós-tratamento, reticulação periférica e espessamento peribroncovascular.(Shikania-Yasuda et. al. 2006)

A PCM é a oitava causa de morte no Brasil, considerando-se as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas. No Paraná, onde é diagnosticada em quase todo o estado, corresponde à quinta causa de óbitos por doença dessa natureza e é onde está registrada a maior taxa de mortalidade por PCM do Sul e Sudeste (Coutinho, 2015). É endêmica em países da América Latina, desde o México até a Argentina, com prevalência em países da América do Sul (Restrepo et al, 2001). No território brasileiro, a incidência dessa micose é maior nas regiões Sul, Sudeste e Centro – Oeste (Wanke et al., 1994)

Apesar de ainda não estar totalmente esclarecido o habitat e o ciclo de vida do *P.*

brasiliensis, diversos estudos ecoepidemiológicos sugerem que esse fungo sobreviva na sua fase miceliana, de forma saprófita, em regiões com vegetação perturbada e solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com pequenas alterações de sua temperatura (Restrepo, 1985; 2001). O contágio ocorre pela inalação de propágulos (conídios) infectantes que, atingindo os pulmões, podem desenvolver o foco primário ou disseminar por via linfo-hematogênica em diferentes órgãos ou sistemas (Restrepo, 1985) (Figura 3). O desenvolvimento da PCM depende da interação entre o fungo e hospedeiro, sendo a adesão às células e à superfície da mucosa do hospedeiro, importantes no estabelecimento da infecção. Dessa forma, o fungo pode penetrar ativamente à superfície mucocutânea e parasitar as células epiteliais, escapando assim, das defesas do hospedeiro, e atingir os tecidos mais profundos por via linfo-hematogênica (Brito et al., 1973). A infecção geralmente ocorre na infância ou na adolescência e sua evolução depende da virulência do fungo, da quantidade de conídios inalados e da integridade do hospedeiro. Após longo período de latência do fungo em um nódulo fibrótico no pulmão, um desequilíbrio na relação entre hospedeiro e parasita pode ocorrer, e o paciente, então, evolui para os sinais e sintomas da doença. Sendo assim, apesar de o contato inicial do homem com o fungo e a infecção ocorrerem, muitas vezes, na infância, as manifestações clínicas da paracoccidioidomicose, em geral, são vistas em pacientes adultos (Bisinelli & Ferreira, 2002).

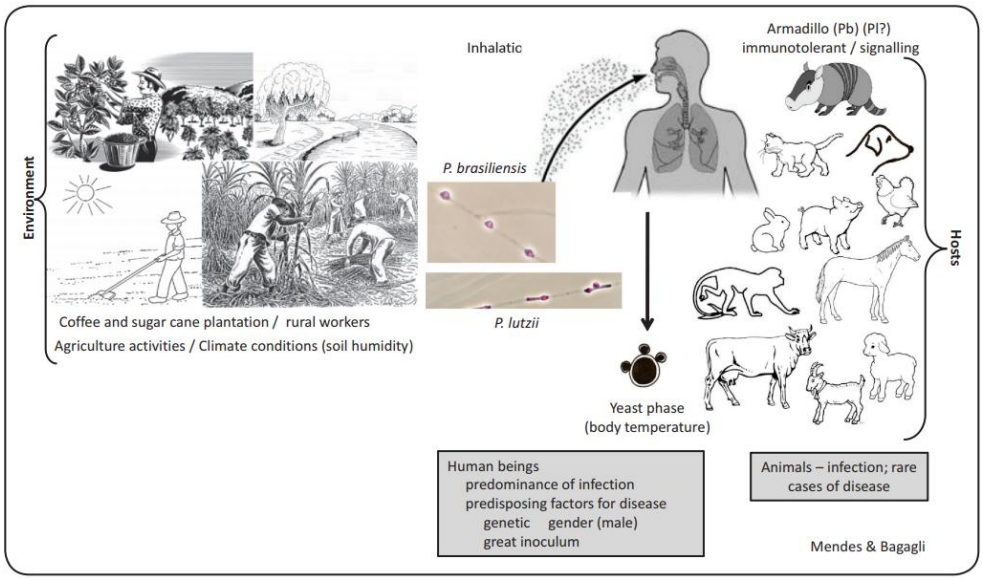

Figura 3: Esquematização de possíveis meios de contagio, fatores de risco e possíveis hospedeiros (reproduzido do Consenso Brasileiro de Paracoccidioidomicose Shikanai-Yasuda et. al.,2017)

Quando a doença se estabelece, é caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, agrupadas em duas formas principais:

Forma adulta ou crônica: A maioria (74% a 96%) dos casos de PCM está na forma crônica, que tipicamente se manifesta em adultos entre as idades de 30 e 60 anos. Geralmente de evolução mais lenta e menos agressiva, em 90% dos pacientes com PCM, observa-se comprometimento pulmonar, após os pulmões, os órgãos mais afetados pela forma crônica são as mucosas das vias aero digestivas superior e pele, a PCM crônica pode ser classificada como leve, moderada ou grave. A resposta imune humoral é variável e a resposta celular é preservada (Franco, 1986).

Forma juvenil ou aguda / subaguda: É mais grave que a forma adulta ou cronica e afeta predominantemente jovens de ambos os sexos comprometendo preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos, medula óssea) (Giraldo et al., 1976), os pacientes com esta forma da doença podem apresentar linfadenomegalia localizados ou generalizados, que pode apresentar supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia. Os sintomas também podem incluir manifestações cutâneas (ou mucosas), lesões osteoarticulares, raramente envolvimento pulmonar, febre, peso perda e anorexia geralmente acompanham a apresentação clínica (Shikanai-Yasuda et al. 2017). A resposta imune celular usualmente está deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos (Franco, 1986).

Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de terapia leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (Bernard et al., 1996)

Na PCM, como em outras micoses, o diagnóstico considerado como padrão-ouro é o isolamento do agente etiológico em cultura. Os métodos diretos incluem exames microscópicos de espécimes biológicos do paciente (pus, escarro, biópsia), exames histopatológicos e cultivo em meio de cultura próprio para isolamento do agente. Quando órgãos internos são atingidos, os testes sorológicos têm especial valor, sendo o mais utilizado a imunodifusão em gel de ágar (ID). Esses testes revelam a existência do microrganismo antes mesmo dos exames de cultura e histopatológico e são de amplo uso na confirmação da doença e no acompanhamento do tratamento ambulatorial. (Shikanai-Yasuda et. al., 2006, Moreira, 2008)

O tratamento da doença é normalmente prolongado, podendo durar até cinco anos. Atualmente, é feito à base de sulfas e/ou drogas antifúngicas, seguido de acompanhamento pós-terapêutico. As drogas frequentemente utilizadas são itraconazol, cetoconazol, sulfametoxazol, trimetroprim e anfotericina B, que apresentam eficiência significativa, mas severos efeitos colaterais. O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado como do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. No momento o tratamento de escolha para pacientes com formas leves a moderadas de PCM é o itraconazol na dose de 200 mg por dia, a duração do tratamento pode variar de 9 a 18 meses, com duração média de 12 meses, devendo o paciente ser sempre avaliado por critérios clínicos, imunológicos e radiológicos. Para formas graves e disseminadas de PCM, a anfotericina B desoxicolato ou na formulação lipídica (complexo lipídico) é indicada para uso. A dose de indução recomendada da anfotericina B convencional é de 0,5-0,7mg / kg / dia, com um máximo de 50mg / dia. As formulações lipídicas devem ser prescritas em doses de 3 a 5mg / kg / dia. A duração do tratamento depende da estabilidade clínica do paciente, a anfotericina B deve ser administrada pelo menor tempo possível (em média 2 a 4 semanas). A transição para medicação oral durante a fase de consolidação deve ocorrer após a estabilização clínica, uma vez que a absorção oral do medicamento tenha sido confirmada. (Shikanai-Yasuda et. al., 2017)

Entretanto, a erradicação do fungo nos tecidos é demorada e os doentes devem ser periodicamente examinados por meio de exames clínicos e complementares para avaliar se ocorreu ou não a regressão dos sintomas e desaparecimento das lesões ativas (PALMEIRO et al., 2005).

1.2 RESPOSTA IMUNE NAS MICOSES

A defesa imunológica do hospedeiro contra as micoses sistêmicas é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos (Huffnagle & Deepe, 2003). Os elementos inatos constitutivos incluem a pele e as superfícies epiteliais das mucosas. Além de proteínas do complemento e anticorpos naturais, que opsonizam as células fúngicas, facilitando a fagocitose pelas células fagocitárias profissionais da defesa imunológica inata: as células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (Mecizhitov & Janeway, 1997; Romani, 2004).

Os macrófagos integram o sistema de fagócitos mononucleares pertencentes a

uma família de células que tem uma linhagem comum, que se originam da medula óssea, circulam no sangue como monócitos e quando estabelecidos nos tecidos, essas células amadurecem e se tornam macrófagos. O fenótipo desses macrófagos depende diretamente do ambiente em que se encontram (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Participam na imunidade inata e adquirida, e sua ativação é fundamental para controlar o crescimento do patógeno. Além disso, macrófagos teciduais existem em maior número do que as células dendríticas, podendo assim exercer um importante papel regulador da imunidade inata. A atividade fungicida de macrófagos mostrou- se mediada pela produção de óxido nítrico, bem como pela depleção de metabólitos fundamentais para o crescimento de fungos (Gonzalez et al., 2004; Cano et al., 1994; Brummer et al., 1988; Brummer et al., 1989). Os macrófagos desempenham papel crítico na imunidade inata, fagocitando partículas estranhas e produzindo citocinas. Atuam também como importantes células assessoras e efetoras na imunidade adquirida, apresentando antígenos aos linfócitos T (Metzer, 2000; Fujiwara & Kobayashi, 2005).

A indução de uma resposta imune no hospedeiro determina a natureza e a severidade do curso da doença. Na maioria das micoses, monócitos/macrófagos são críticos em funções imunes efetivas, implicados em mecanismos inatos contra infecções fúngicas (Louie, et al., 1994; Smith, et al., 1990). Essas células têm um papel importante na regulação de produção de citocinas, funcionando como mediadores de resposta inflamatória. Como observado em outras micoses sistêmicas, a defesa mais relevante do hospedeiro contra a PCM é a imunidade celular mediada principalmente por interferon-γ durante a ativação de macrófagos (Kashino et al., 2000).

Na doença humana, a dicotomia Th1 / Th2 de células T CD4 + parece explicar em parte o comportamento de pacientes com PCM e indivíduos infectados saudáveis. Uma resposta Th1 pode ser observada de melhor forma quando linfócitos de pacientes curados e indivíduos infectados saudáveis foram estimulados in vitro com GP43 e foi observada uma alta produção de IL-2 e INF-γ com uma alta resposta linfoproliferativa. Já a resposta Th2 parece estar mais relacionada a forma aguda da doença onde encontramos uma alta produção de IL-4, IL-5, IL-10 associada com uma baixa proliferação de células T, podendo ser revertida no tratamento in vitro utilizando anti-IL-10 e R-IL-12. As formas crônicas mais severas da doença aparentemente apresentam também um padrão de resposta Th2, já os pacientes que apresentam a forma crônica da doença exibem um padrão misto Th1/Th2, não polarizado, isto pode estar

correlacionado com fatores imunoreguladores de células T (Calich, 2008, Cavassani, 2006).

A reposta adaptativa celular foi considerada por muitos anos a grande responsável pelo controle da maioria das infecções fúngicas. Porém, a resposta inata também é fundamental, sendo ela quem precede e dá início aos processos mais específicos. Além das barreiras físicas como a pele, os principais protagonistas da imunidade inata são os fagócitos profissionais: neutrófilos, macrófagos/monócitos e células dendríticas. Tais células são capazes de ingerir (via fagocitose) e/ou inibir o crescimento de patógenos, podendo atuar como APCs, e secretar citocinas, quimiocinas e moléculas inflamatórias que modulam a infecção (Almeida, 2008).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra infecções, sendo capaz de identificar diversas classes de patógenos – vírus, bactéria, fungo e parasitas – com base na detecção de PAMPs, que são moléculas conservadas através da evolução, comuns entre os membros de uma mesma classe e sem similaridade com moléculas de mamíferos (Kindt et.al. 2007).

Os mecanismos de citotoxicidade promovidos por estas células têm por base a geração de espécies oxidativas, principalmente aquelas relacionadas ao oxigênio e ao nitrogênio, que, embora idealmente devem se limitar ao patógeno, podem trazer efeitos deletérios ao hospedeiro principalmente em situações de cronicidade.

Os macrófagos também representam uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, sendo capazes de realizar fagocitose e apresentar antígenos. Estão presentes em diversos tecidos e órgãos, e são originárias a partir dos monócitos do sangue.

Matzinger (2002) sugeriu um modelo complementar no qual a imunidade inata também seria capaz de identificar sinais de perigo (DAMPs) liberados pelas células injuriadas pela ação de patógenos. Assim, além de detectar o patógeno diretamente, o sistema imune também investigaria os danos que estes agentes possam ter causado ao hospedeiro. Tanto os PAMPs quanto os DAMPs são detectados através de diversos receptores localizados na membrana celular, no citoplasma ou que ainda são secretados, sendo genericamente denominados PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão). A especificidade de cada receptor já está codificada no genoma das células do hospedeiro e as principais classes de PRRs identificadas até o momento são: receptores tipo-Toll (TLRs), receptores lectina tipo C, receptores tipo RIG-I e receptores tipo Nod (NLRs)

(revisado por DAVIS et.al., 2011).

1.3. INFLAMASSOMOS e NLRs

Os NLRs são uma família de proteínas citossólicas que atuam como sensores da imunidade inata (revisado por MARTINON et.al., 2009). Atualmente são conhecidos 22 membros desta família em humanos e 30 nos camundongos (revisado por ZAMBETTI et.al., 2012) e, em termos estruturais, os NLRs são estruturas tríplices, formadas por: (I) um domínio C-terminal rico em leucina (LRR) responsável pelo reconhecimento do ligante; (II) um domínio central ligador de nucleotídeos (NBD) e (III) um domínio N-terminal variável responsável pelas funções efetoras (revisado por BAUERNFEIND et.al., 2011).

Em função do tipo de domínio N-terminal, os NLRs podem ser divididos em quatro classes (revisado por BAUERNFEIND et.al., 2011):

(i) NLRAs (domínio de ativação ácido),

(ii) NLRBs (domínio BIR – baculovírus inibidor de apoptose),

(iii) NLRC (domínio CARD – domínio recrutador de caspase) e (iv) NLRPs (domínio pirina).

Embora pouco se saiba sobre o papel exato de todos os membros desta família na homeostase do organismo, alguns NLRs estão consideravelmente caracterizados, sendo a formação do inflamassomo a via principal de sua atividade.

Os inflamassomos são definidos classicamente como um complexo molecular envolvidos na ativação de caspases inflamatórias (sendo a caspase-1 seu representante mais emblemático) responsáveis pelo processamento e ativação das citocinas pró-inflamtórias IL-1β e IL-18 (revisado por MARTINON et.al.,2009).

Quatro inflamassomos clássicos foram descritos até hoje, denominados segundo o NLR envolvido (revisado por BAUERNFEIND et.al., 2011): NLRP1 (associado ao reconhecimento de toxina de Bacillus anthracis), NLRC4 ou IPAF (reconhecimento de flagelina e proteínas do sistema de secreção do tipo III de bactérias em concerto com receptores NAIP), AIM2 (não é um NLR, mas é associado ao inflamassoma, reconhecendo DNA) e NLRP3 (detalhado mais à frente).

De forma geral, ao serem ativados, os NLRs se oligomerizam, formando plataformas multiprotéicas. Caso disponham de um domínio CARD podem recrutar diretamente a caspase-1, que também apresentam deste domínio. Do contrário, o recrutamento da caspase requer uma proteína adaptadora, ASC, que apresenta um domínio CARD e um domínio Pirina que interage com o resíduo N-terminal dos NLRPs (revisado por Martinon et.al., 2009). Uma vez recrutada a caspase-1, esta sofre uma clivagem autoproteolítica liberando fragmentos de 10 (p10) e 20 kDa (p20), que por sua vez forma um tetrâmero que é forma ativa da enzima, capaz então de ativar a IL-1β e IL-18 (revisado por Bauernfeind et.al., 2011). Além da função clássica na ativação de citocinas, a caspase-1 também tem sido correlacionada a uma nova modalidade morte celular, denominada piroptose (revisado por Lamkanfi, 2011). Na piroptose, existe uma perda da integridade da membrana celular, havendo formação e extravasamento do conteúdo citossólico,e degradação do material genético, com fragmentação do DNA e condensação do núcleo. Como resultado, a célula morre produzindo uma série de elementos pró-inflamatórios. A princípio, a dependência do processo em uma caspase indicaria um processo programado, similar ao programa de morte por apoptose, contudo, o caráter inflamatório da piroptose estaria em concordância com processo de necrose (revisado por Labbé & Saleh, 2008).

Embora ainda pouco se saiba sobre como este processo seja deflagrado, a proteína ASC parece exercer um papel relevante. A piroptose tem sido correlacionada principalmente ao inflamassomo NLRC4, que a princípio dispensa a ação da ASC, mas que ainda assim seria capaz de interagir pelos domínios CARD. De fato, demonstrou-se que quando existe o intermédio da ASC, a caspase-1 exibe o fenótipo clássico de protease ativadora de citocinas, enquanto que sem a ASC privilegia-se a função piroptótica (revisado por Horvath et.al., 2011).

Com relação ao inflamassomo NLRP3, as informações, embora abundantes, ainda carecem de certezas. Foi atribuído a este receptor o reconhecimento de uma gama imensa de PAMPs e DAMPs que não exibem semelhanças estruturais ou funcionais entre si: determinantes virais, componentes fúngicos, toxinas bacterianas formadoras de poros, ATP, cristais de colesterol ou ácido úrico, partículas inertes (sílica, asbestos), proteínas β-amilóide (revisado por BRYANT & FITZGERALD, 2009).

Admite-se que sua ativação é, na realidade, um processo indireto, em que os ativadores do receptor induzam a produção de mediadores intracelulares em comum e

que estes, por sua vez, sejam os ativadores propriamente ditos do NLRP3. Assim, o modelo proposto se fundamenta em três vias (revisado por ZAMBETTI et.al., 2012):

(I) Efluxo de K+ (CHU et.al., 2009): toxinas bacterianas podem induzir a formação de poros na membrana eucariótica, causando à perda do conteúdo intracelular. O efluxo de K+ em particular foi correlacionado com a ativação do NLRP3. O ATP extracelular pode exibir um efeito similar ao ativar canais P2X7 de membrana.

(II) Instabilidade lisossomal: o extravasamento do conteúdo lisossomal foi correlacionado à ativação do NLRP3 através da ação da catepsina B. Esta via tem sido correlacionada principalmente a materiais particulados, que, sendo fagocitados, interfeririam diretamente no lisossomo.

(III) Espécies reativas de oxigênio (ROS): o estresse oxidativo também foi associado ao NLRP3. A produção de ROS é uma das ferramentas de eliminação de patógenos do organismo. A fonte dessas espécies nos fagócitos é o sistema da NADPH oxidase, porém recentemente também tem se atribuído à mitocôndria um papel de destaque. Neste caso, a produção de ROS é consequência da cadeia respiratória, em que alguns elétrons fogem do sistema e reduzem o oxigênio citoplasmático a ânion superóxido. Adicionalmente, SHIMADA et.al. (2012) propuseram que as ROS mitocondriais oxidariam o DNA da organela e este material oxidado seria então o provável ativador do inflamassomo. Esta via tem sido correlacionada a diversas condições patológicas, desde doenças metabólicas a processos infecciosos uma vez que o estresse oxidativo é um processo comum em várias condições fisiopatológicas.

Os inflamassomos, indiscutivelmente, estão relacionados à reposta imune em processos infecciosos. O inflamassomo NLRP1 é importante no reconhecimento da toxina de B.anthracis e de muramildipeptídeo bacteriano (revisado por BAUERNFEIND et.al., 2011). O inflamassomo AIM2 é importante em processos que envolvam DNA no citossol, como processos virais (revisado por BAUERNFEIND et.al., 2011) ou mesmo bacterianos, como a infecção por Francisella (JONES & WEISS, 2011). O inflamassomo NLRC4 está relacionado a infecções bacterianas, sendo também a piroptose um mecanismo importante na resposta contra Shigella (SUZUKI et.al., 2007), Legionella (WHITFIELD et.al., 2011) ou Salmonella (revisado por FINK & COOKSON, 2007).

Dada a diversidade de estímulos relacionados à ativação do inflamassomo

NLRP3, é compreensível a diversidade de processos patológicos com os quais está envolvido. De imediato, o NLRP3 está correlacionado às denominadas doenças autoinflamatórias, assim mdenominadas por dispensarem a participação da imunidade adaptativa (característica de doenças auto- imunes): síndrome autoinflamatória fria familial, síndrome de Muckle-Wells e doença inflamatória multissistêmica de início neonatal – relacionadas a mutações no NLRP3, conferindo-se ativação espontânea (BRYDGES et.al., 2009). E ele também exerce papel na patogênese de doenças metabólicas/sistêmicas, como obesidade (STIENSTRA et.al., 2010) e diabetes tipo 2 (SCHRODER et.al., 2010).

Com relação às micoses, as informações ainda são incipientes. O inflamassomo mais relacionado é o NLRP3. Sua participação já foi demonstrada em infecções por *Candida albicans* (GROSS et.al., 2009; HISE et.al., 2009) e *Aspergillus fumigatus* (SAÏD-SADIER et.al., 2010). KUMAR et.al. (2009) mostraram que β-glucanos podem ser um dos determinantes fúngicos envolvidos na ativação do NLRP3, embora não de forma direta, em concordância com os mecanismos de ativação anteriormente citados.

Tavares e colaboradores (2013) em estudo de infecção com Paracoccidioides brasiliensis em modelos animais, mostrou a ativação de IL-1β e uma correlação com a ativação de NLRP3 dependente de caspase-1 além de todos os processos já citados para ativação do inflamossomo.

Ketelut-Carneiro (2015) também em estudos com modelos animais mostrou que NLRP3 pode ter um papel importante na resistência contra o P. brasiliensis porque orquestra robusta ativação caspase-1 e desencadeia uma resposta pró- inflamatória dependente de IL-18.

1.4. Toll-Like Receptor - TLRs

Embora classicamente o estudo de cada PRR tenha sido feito isoladamente, o paradigma atual da Imunologia afirma que existe um diálogo entre os diferentes PRRs e suas vias de sinalização, de forma que a resposta imune final depende do balanço e da contribuição de cada receptor. De fato, considerando que um único patógeno exibe diferentes PAMPs e é capaz de induzir mais de um DAMP no hospedeiro, é mais do que razoável crer que existe a ativação simultânea de diferentes PRRs (revisado por KAWAI e AKIRA, 2011).

Assim, cresce cada vez mais o número de estudos que evidenciam a relação entre os PRRs.

Descrito pela primeira vez em 1996 por Jules Hoffman e colaboradores, que observaram um receptor que apresentava ter papel essencial na imunidade da mosca *Drosophila melanogaster* à infecção fúngica, através da ativação da síntese de peptídeos antimicrobianos (figura 4) Em 1997 Medzhitov e Janeway demonstraram que a indução do receptor de "toll-like" (TLR4) humano homólogo ao da drosófila auxiliava na ativação da resposta adaptativa. Até hoje foram caracterizados por volta de 11 TLRs, todos eles são glicoproteínas integrais de membrana (celular ou endossomal) do tipo I. Estruturalmente podem ser divididos basicamente em uma porção extracelular rica em leucina (do tipo LRRs), responsável pelo reconhecimento do ligante, e um domínio citoplasmático homólogo a Toll/IL-1R (TIR) necessário à sinalização intracelular (revisado por LEE & KIM, 2007).

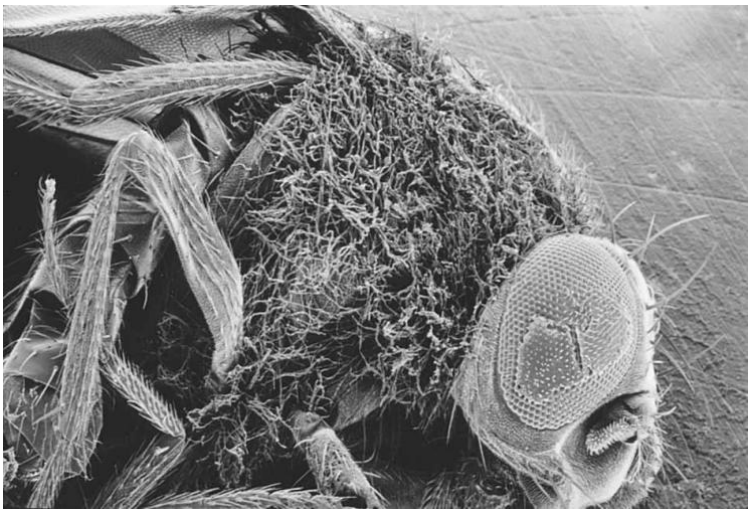

Figura 4 Drosófila morta com infecção por A. fumigatus. Eletromicrografia de varredura de um adulto de *Drosophila* que sucumbiu à infecção por *A. fumigatus* e é coberta com hifas germinativas (adaptada de Leimaitre et.al., 1996).

Os PAMPs reconhecidos pelos TLRs são de natureza diversa entre seus diversos ligantes, os mais caracterizados são peptidoglicanos (PGN) (ligantes de TLR2), lipoproteínas bacterianas (ligantes de TLR1, TLR2 e TLR6); flagelina, componente do flagelo microbiano (ligante de TLR5); sequências de DNA não metilados, (CPG), presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9); RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3); LPS presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante de TLR4), RNA de fita simples (ligantes de TLR7 e TLR8), entre outros. Mas, em essência, a sinalização deflagrada pode ser de dois tipos, ambas através de moléculas

adaptadoras:

- MyD88 (todos os TLRs exceto TLR3), que culmina na ativação das MAP quinases e de NF-κB (transcrição de fatores pró- inflamatórios) ou
- TRIF (TLR4 e TLR3) que ativa NF-κB e IRF 3 e 7, relacionados à produção de IFN tipo I - resposta antiviral (revisado por KAWAI e AKIRA, 2011).

Sendo o TLR4 é o único receptor que pode ativar tanto a via de MyD88 quanto a via de TRIF. TLR4 reconhece seu ligante na superfície celular resultando no recrutamento e sinalização por meio de MyD88, em seguida, é internalizado em endossomas e desencadeia a sinalização dependente de TRIF com o auxílio da proteína adaptadora TRAM (figura 5). (KAGAN et al., 2008; FITZGERALD et al., 2003)

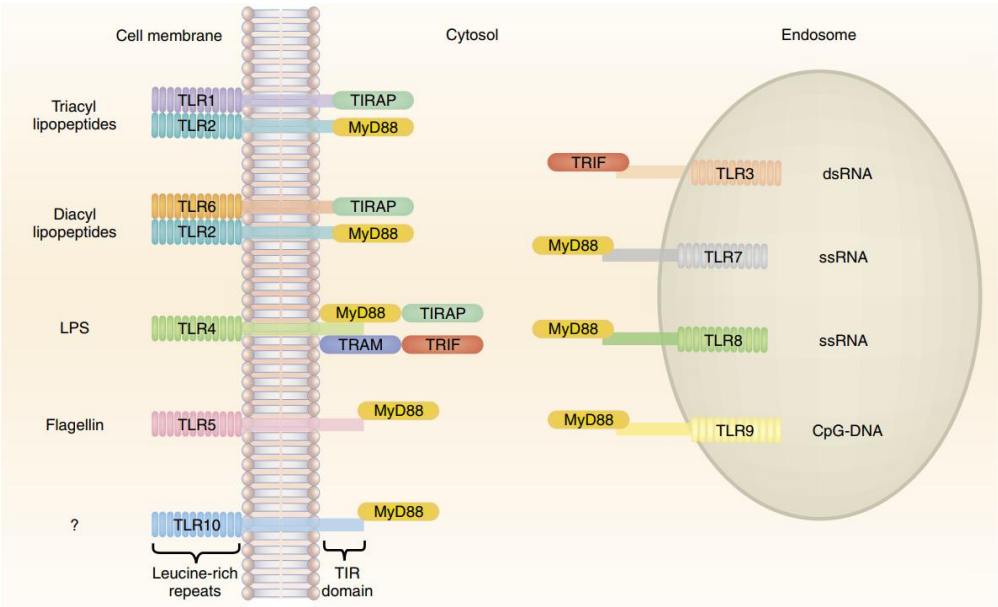

Figura 5 Diagrama esquemático de TLRs: Sinalização mediada por TLRs e as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF (Kanzler, 2007)

A transcrição de genes pró-inflamatórios promovida pelos TLRs é fundamental para a atividade dos inflamassomos uma vez que geralmente os níveis constitutivos pró-IL-1β, caspase-1 e NLRP3 são baixos e, portanto, é necessária uma etapa de "primagem" para que a ativação do inflamassomo ocorra em níveis significativos (revisado por LEE & KIM, 2007). A necessidade de um controle transcricional dos inflamassomos adquire significado quando se considera o forte potencial inflamatório da IL-1β: a produção da citocina é condicionada por dois estímulos – uma via PAMPs

(TLR), que sinaliza a presença de um microrganismo e um via DAMPs (NLR) que indica realmente um processo patogênico, isto é, de dano ao hospedeiro (revisado por NETEA et.al., 2010).

A contribuição dos TLRs pode variar dependendo da espécie fúngica, tipo morfológico, rota de infecção e receptor envolvido. Vários trabalhos vêm demonstrando a interação destes receptores com diferentes espécies fúngicas. TLRs como TLR2, TLR4 e TLR9 e seus ligantes são os mais relacionados às infecções fúngicas**.** (Veerdonk 2008)

Na PCM estudos em modelos murinos demonstram uma grande importância da ativação de TLR2 na infecção pulmonar, com maior produção de IL-10, inibição do perfil de resposta Th17 e promoção da expansão de células T reguladoras (Treg), contendo a reação inflamatória exacerbada e consequentemente, reduzindo a patologia pulmonar, no reconhecimento e fagocitose de leveduras do P. brasiliensis, na produção de NO pelos macrófagos murinos (CALICH et al., 2008, LOURES et al., 2009)

Ainda em estudos com modelo murinho, foi demonstrado que a ausência de TLR4 é benéfica para o hospedeiro no início da infecção, porém, ao longo do curso da doença a ausência deste receptor resulta na em diminuição de citocinas de resposta Th1 e Th17, e é fortemente controlada por células Treg, resultando no aumento da carga fúngica. Em ensaios in vitro, macrófagos deficientes de TLR4 apresentaram menor capacidade fagocítica, diminuição da produção de NO e IL-12. Ambos os mecanismos levaram a uma evolução crônica da infecção (LOURES et al., 2010).

Loures e colaboradores (2011) sugeriram em ensaios in vivo, que a ausência de MyD88 causa profundos efeitos na ativação celular, com menor fluxo de célula T CD4 ativadas no pulmão dos animais, maior carga fúngica pulmonar e disseminação do fungo para outros orçãos. Os animais deficientes de MyD88 infecção mais grave e mortalidade precoce na PCM experimental.

1.5. DECTINA-1

A dectina-1 (CLEC7A) é o principal representante dos receptores de lectina tipo C (CLRs), que são uma família de proteínas ligadoras de carboidratos dependente de cálcio. Também são proteínas de membrana, cuja porção extracelular é um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRDs). Quanto à porção intracelular, podem ser

divididos em duas classes:

(i) Cauda citoplasmática que contém um imunorreceptor com motivo de ativação baseado em tirosina (ITAM), no qual se insere a dectina-1.

(ii) Cauda citoplasmática curta que requer associação a uma cadeia FcRγ para sinalização (dectina-2) (revisado por Kingeter & Lin, 2012).

Na realidade, o resíduo da dectina-1 é denominado hemITAM, pois, ao ser ativada, é preciso que haja dimerização de dois hemITAMs para que o receptor seja funcional. Em seguida, ocorre a fosforilação dos resíduos de tirosina pelas quinases SRC, e o sistema pode, então, recrutar e ativar a SYK (spleen tyrosine kinase), uma enzima que fosforila e ativa diversos alvos celulares. Destes, destaca-se o sistema CARD9-BCL-10-MALT1, que atua como uma plataforma para a ativação de NF-κB. Outro efeito desencadeado pela SYK é a produção de ROS, mas cujo mecanismo ainda não foi elucidado (revisado por Mócsai et.al., 2010).

Ferwerda e colaboradores em 2008 utilizando monócitos e macrófagos humanos, estimulados com curdlan, um polímero beta-1,3-glucana linear derivado de *Alcaligenes faecalis* com afinidade específica para dectina-1, em combinação com o ligante sintético para TLR2 Pam3Cys e o ligante para TLR4 ultrapuro LPS, demonstrou um importante sinergismos entre ambas as vias de TLR2 e TLR4 e dectina-1 para a produção de TNF-alfa.

A dectina-1 é um PRR fortemente relacionado ao reconhecimento de fungos através dos resíduos de carboidratos, principalmente β-glucanos (Kumar et.al. 2009). Também ela exibe uma relação estreita com os inflamassomos. Através da ativação de NF-κB, existe uma promoção da transcrição de genes pró-inflamatórios, como a IL-1β (Kankkunen et.al., 2010), porém, além disso, fala-se ainda em uma participação direta na ativação do inflamassomo através da produção de ROS (Mankkunen et.al., 2010, Mócsai et.al., 2010).

Através dessas relações, Cheng e colaboradores em 2011 demonstraram que a discriminação entre a forma patogênica (hifa) da comensal (levedura) de *C.albicans* depende do reconhecimento diferencial via dectina- 1 e a consequente ativação do inflamasomo, que, por meio da IL-1β, foi determinante na definição de um perfil de resposta adaptativa Th17 protetor, recentemente em 2014 Ganesan e colaboradores demonstraram também que a associação da ativação da dectina-1 e C3 induzia uma via

alternativa da produção da citocina em células dentricas murinas.

Na PCM alguns estudos participação de TLR2, TLR-4 e dectina-1 em monócitos humanos no reconhecimento de P. brasiliensis, internalização e consequente modulação da resposta imune contra o fungo. (Bonfim et. al. 2009)

Loures e colaboradores em 2014 utilizando modelo murino, demonstrou que a deficiência de dectina-1 leva a um aumento da carga fúngica nos tecidos e maior mortalidade, além de reduzir a produção de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, a ativação e migração de células T para o local da infecção.

Tendo em vista a importância do envolvimento dos PRRs das células da imunidade inata no reconhecimento, internalização e modulação de uma resposta imunológica protetora contra infecções fúngicas, nosso trabalho visa compreender melhor a interação entre leveduras de *P. brasiliensis* e células de pacientes com PCM

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do nosso trabalho é estudar a interação entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose, modulando a ativação de receptores de reconhecimento padrão por meio da interação destas células com leveduras de *P. brasiliensis* e agonistas de PRR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos incluem:

- Determinação da expressão dos receptores TLR-4, dectina-1, NALP-3 e das proteínas Caspase-1, caspase-8 ASC em células de pacientes comparados com controles.
- Avaliar a importância dos receptores TLR-4, dectina-1, NALP-3 na produção de citocinas pro-inflamatória como: TNF-α, IL-1β, IL12p70, IL18.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FUNGO E CULTIVO:

Foi utilizada a cepa virulenta Pb18 do *P. brasiliensis* que se encontra no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Será mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK - Alemanha), em estufa a 37ºC, com repiques de 15 a 20 dias.

3.2. PREPARAÇÃO DO INÓCULO DO PB18

Leveduras da cepa Pb18 foram coletadas em tubo falcon (BD Biosciences) com 10 mL PBS 1x, seguida de centrifugação por 1 minuto a 3000 RPM (1500 g). O sobrenadante, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi transferido para outro tubo falcon com auxílio de seringa de insulina (BD Biosciences) e, posteriormente foi realizada a filtragem com auxílio de cell strainer 40 μm (BD Biosciences). A suspensão obtida foi novamente coletada e filtrada com auxílio do cell strainer 40 μm (BD Biosciences), de forma que essa etapa foi realizada por 3 vezes no total. Em seguida, realizou-se a contagem do número de células em câmara de Neubauer

3.3. AMOSTRA CLÍNICA

As amostras de sangue periférico, utilizadas para as diversas análises, foram obtidas de pacientes com PCM provenientes do Ambulatório de Micoses e da Enfermaria da Clínica de Moléstias Infecciosas Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Hospital e de indivíduos controle, voluntários provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes participarão do estudo voluntariamente, após preenchimento de consentimento informado, de acordo com a resolução Nº. 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Foi informado verbalmente e por meio do TCLE a todos os envolvidos no estudo sobre os potenciais riscos relacionados à coleta de sangue sendo um pequeno desconforto local e a formação de pequeno hematoma. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça. O procedimento de coleta de sangue será realizado na unidade de internação hospitalar, nos casos em que o paciente estiver internado ou na sala de procedimento do prédio do ambulatório para os pacientes que realizarem acompanhamento ambulatorial. Os pacientes que aceitarem ou

recusarem participar do estudo receberam o mesmo tratamento e não sofreram nenhum prejuízo em relação ao seu acompanhamento.

3.4. CRITÉRIO DE INCLUSÃO

3.4.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram incluídos todos os pacientes com quadro clínico sugestivo de PCM, tanto em sua forma aguda/subaguda ou crônica comprovada por exames micológicos, histopatológico e/ou teste sorológico positivo para PCM. Sendo estes 6 pacientes de forma Aguda/Subaguda e 4 pacientes de forma Crônica, com uma média de 30 anos nos pacientes da forma aguda/subaguda e de 60 anos nos pacientes de forma crônica (tabela1).

PACIENTE	SEXO	IDADE	FORMA CLINICA	TEMPO DE TRATAMENTO	ETINIA
WGDS	Masculino	56 anos	Crônica	20 Dias	Parda
SDG	Masculino	68 anos	Crônica	0 Dias	Parda
MJB	Feminino	65 anos	Crônica	0 dias	Branca
CMDS	Feminino	58 anos	Crônica	0 dias	Branca
RGS	Masculino	35 anos	Aguda-subaguda	28 Dias	Parda
DFA	Feminino	26 anos	Aguda/Subaguda	20 Dias	Parda
MGR	Masculino	32 anos	Aguda/Subaguda	0 dias	Parda
MAAR	Feminino	29 anos	Aguda/Subaguda	0 Dias	Parda
KDSN	Feminino	24 anos	Aguda/Subaguda	0Dias	Parda
MRO	Masculino	31 anos	Aguda/Subaguda	0 Dias	Parda

Tabela 1: Tabela descritiva de pacientes inseridos no estudo.

3.4.2. SELEÇÃO DOS CONTROLES

Foram selecionados 10 Pacientes considerados sadios e que não possuem histórico da infecção fúngica.

3.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os pacientes com PCM que estejam recebendo tratamento para a doença em questão por mais de 60 dias e aqueles pacientes com co-infecção com

tuberculose, HIV/AIDS e hepatites viral aguda e crônica.

Os indivíduos controle foram excluídos caso apresentem qualquer comorbidade infecciosa atual ou crônica como hepatites virais, HIV/AIDS e tuberculose.

3.6. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES

Foram coletados 60mL de sangue venoso em tubos a vácuo contendo heparina como anti-coagulante para obtenção de células mononucleares. As amostras foram adicionadas a 30mL Ficoll-Hypaque (BOYUM et al., 1968) (SIGMA – USA) e centrifugada a 4 °C por 20 minutos a 900 g. O anel contendo as células foi aspirado com pipeta de 1mL e as células foram lavadas duas vezes com meio de cultura RPMI-1640 (SIGMA – USA) sendo ressuspendidas na concentração de $2x10^6$ células e plaqueadas para aderência, após 3 horas de cultura o sobrenadante foi colhido e as células aderidos foram lavadas com meio gelado para se soltarem da placa de cultura.

3.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PRRS E NODS EM CELULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES E CONTROLES

3.7.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total das amostras de monócitos interagidos com Pb18 foi realizada com o Trizol Reagent (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em 1,0 mL de Trizol (1,0 mL de Trizol para 2x106 células) e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (MERCK) por 1 mL de trizol e agitou-se com as mãos por 15 segundos. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 15000 g por 15 minutos à 4 °C, sendo que o sobrenadante transferido para outro tubo. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico (SIGMA) e congelado à -80 °C por 2 horas para um melhor rendimento. As amostras foram, então centrifugadas por 30 minutos a 15000 g à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 75 % (1 mL etanol (SYNTH) para 1 mL trizol). As amostras foram vortexadas e centrifugadas a 15000 g por 5 minutos à 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi seco por 10 minutos no SpeedVac. Posteriormente as amostras foram ressuspendidas em água DEPC (Invitrogen – contém 0,1% diethylpyrocarbonate) e incubadas por 10 minutos à 55- 60 °C. A integridade do RNA foi verificada em gel de

desnaturante.

3.7.2. GEL DE DESNATURANTE

Para cada gel de 40 mL, colocou-se em um erlenmeyer 25 mL de água miliQ e 0,45 g de agarose, que depois foi fundido em micro-ondas. Numa capela, adicionou-se 2,8 mL de tampão MOPS e 2,3 mL de formaldeído (SYNTH). Aguardou-se o gel polimerizar em torno de 30 minutos. Nesse intervalo, as amostras foram preparadas com tampão de RNA (3 partes de tampão para 1 parte de RNA), as amostras foram então aquecias à 60 ºC por 5 minutos. Após a polimerização, o gel foi transferido para uma cuba de eletroforese e adicionou-se tampão TBE (LGC Biotecnologia) 0,5x até cobrir todo o gel. As amostras foram adicionadas lentamente nos pocinhos e realizou-se a corrida (100 V por 50 minutos). Após o término da corrida, realizou-se a leitura das bandas formadas em transiluminador UV.

3.7.3. QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Uma alíquota de cada preparação de RNA extraído foi quantificada pelo método espectrofotométrico a 260 nm e a pureza avaliada em um comprimento de onda de 280/260nm (Beckman DU 640 spectrophometer).

3.7.4.PUREZA DO RNA TOTAL

De modo a verificar a integridade do RNA extraído, realizou-se eletroforese em gel desnaturante. Para isso, o gel foi preparado com agarose, MOPS 10x, formaldeído e água miliQ. O tampão de corrida usado foi o MOPS 10x. Nas amostras de RNA adicionou-se tampão de RNA (3 partes de tampão para 1 parte de RNA) e foram aquecidas à 55-60 °C por 5 minutos, a fim de destruir as estruturas secundárias do material. A corrida foi realizada por 20 minutos em uma voltagem de 100 V.

TAMPÃO AMOSTRA DE RNA: Para 1 mL de tampão:

- 145 mL H2O DEPC
- 150 mL MOPS 10x
- 750 mL formamida
- 90 mL formaldeído
- 2 mL brometo de etídeo
- 1 pitada de azul de bromofenol

- Homogeneizou-se tudo e armazenou em geladeira, ao abrigo da luz.

TAMPÃO MOPS: Para 1 L de tampão:

- 83,72 g MOPS (0,4M)
- 8,2 g acetato de sódio
- 20 mL EDTA 0,5M pH=8
- Homogeneizou-se todos os componentes e 700 mL de água MiliQ, em agitador magnético
- Ajustou pH
- Completou para 1 L e depois foi autoclavado
- Armazenou ao abrigo da luz, mantendo sempre estéril.

3.7.5. TRATAMENTO DE RNA COM DNASE

A fim de remover possível DNA genômico das preparações de RNA, o material foi tratado com kit de DNase I (Fermentas). O RNA foi incubado com 10x reaction buffer com MgCL2, DNAse I e água DEPC à 37 °C por 1 hora. Posteriormente, adicionou-se EDTA (1 µL para cada 10 µL do total da reação) e incubou-se à 65 °C por 10 minutos.

3.7.6. SÍNTESE DE CDNA

O RNA tratado com DNase foi convertido em cDNA por transcrição reversa utilizando o kit SuperScript III (Invitrogen), sendo cada reação preparada em um volume final de 20 µL. Inicialmente, 1 µg de RNA foi incubado com oligo DT 50 mM e dNTPmix 10 mM a 65 ºC por 5 minutos, e em seguida, mantido no gelo por mais 1 minuto. Decorrido esse tempo, adicionou-se às amostras uma mistura contendo 25 mM MgCL2, 0,1 M DTT, 40 U/µL RNAse OUT e 200 U/µL se Superscript III RT (Invitrogen) e 2 µL de tampão da reação. A reação de transcrição reversa foi realizada segundo instruções do fabricante. A mistura foi incubada por 50 minutos a 50 ºC, seguida de 5 minutos a 85 ºC. Em seguida as amostras foram colocadas no gelo, onde se adicionou RNAse H e incubou-se por 20 minutos à 37 °C.

3.7.7.PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo cDNA, 5 pmol de cada primer e 10 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) ROX Solution Provided (Fermentas).

Os primers (iniciadores) utilizados no RT-PCR encontram-se na tabela abaixo:

PRIMERS UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-PCR*		
Genes	**Forward**	**Reverse**
NLRP3	GAAGAGGAGTGGATGGGTTT	CGTGTGTAGCGTTTGTTGAG
CASP1	TACAGAGCTGGAGGCATTTG	GATCACCTTCGGTTTGTCCT
CASP-	GGTGCGTCCACTTTCTGGGCA	CCAGGCTCAGGAACTTGAGGGAGG
Dectin-	TGCTTGGTAATACTGGTGTAG	GGTTGACTGTGGTTCTCTT
TOLL-	CGTGCTGGTATCATCTTCAT	GGTAAGTGTTCCTGCTGAG
GAPD	CCACATCGCTCAGACACCATCCAT	GGCAACAATATCCACTTTACCAGA

Tabela 2: Sequência de Primers utilizados nos ensaios de qRT-PCR

Utilizou-se o Sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems 7500 para detectar e quantificar à amplificação do DNA com SYBR Green. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 50 ºC por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95 ºC. Houve 40 ciclos de incubação a 95 ºC por 15 segundos e a 60 ºC por 1 minuto. Cada amostra foi testada em duplicata e todas as quantificações foram normalizadas em relação a um controle endógeno (GAPDH). Expressão relativa foi calculada pelo método de comparação dos valores de CT (limiar da detecção)

3.8. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS PRRS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ADPTATIVA

Células mononucleares de sangue periférico de pacientes ou de controles (2 x 105) foram incubadas na presença ou ausência do fungo (1:1) em placas de 24 poços por 4 horas. Também foi adicionado agonistas dos PRRs curdlan, LPS, Pam3, Imiquimoide e sequencias CpG que ativam respectivamente; Receptores de lectina do tipo C, TLR 4, TLR 2, TLR 7 e TLR 9. O sobrenadante das culturas foi coletado e armazenados a –80 oC para dosagem de citocinas por ELISA de captura (TNF-α, IL-1β, IL-18, IL-12).

3.8.1. DOSAGEM DE CITOCINAS (ELISA)

Os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-18, IL-12p70 foram mensurados com o ensaio imunoenzimático de acordo com instruções do fabricante (Kit da R&D Systems). Em uma placa de 96 poços (Corning) adicionou-se o anticorpo anticitocina de interesse como anticorpo de captura, numa concentração recomendada pelo fabricante, diluído em solução salina tamponada com fosfato – PBS (50 µL/poço). A placa foi mantida durante uma noite à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução tamponada com fosfato contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) e incubada por 1 hora à temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio constituída de 1 % BSA em PBS 1x. Aos poços, adicionou-se, em duplicata, a citocina de interesse recombinante para obtenção de curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante, e então adicionou-se as amostras do sobrenadante de cultura de células interagidos com o fungo e os agonistas, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Então, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. O anticorpo de detecção foi, então, adicionado e a placa foi novamente incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido esse tempo, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e adicionou-se avidina conjugada à peroxidase, por 20 minutos, ao abrigo da luz. Novamente realizou-se a etapa de lavagem e adicionou-se a solução reveladora constituída de TMB (BD Biosciences). A reação foi bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados no programa GraphPad Prism pelo método One-Way ANOVA, e múltiplas comparações serão realizadas pelo teste de Turkey. O nível de significância admitido será de $p < 0,05$ em todas as amostras.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS

Os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-18, IL-12p70 das células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e Indivíduos controle, foram mensurados por ELISA. Não foi possível detectar os níveis de IL-18 e IL-12p70, pois estes estavam abaixo do limiar de detecção do kit.

4.1.1. IL-1β

As células de pacientes com PCM apresentam uma produção basal de IL-1β aumentada em comparação com as células de ínvidos controles, não alterando o perfil de produção de IL-1β mesmo quando estimuladas com os agonistas ou fungo, esse fato não foi observado nas células de Indivíduoscontrole que ao serem estimuladas com os agonistas ou o fungo alteram seu perfil de produção. (Figura 6)

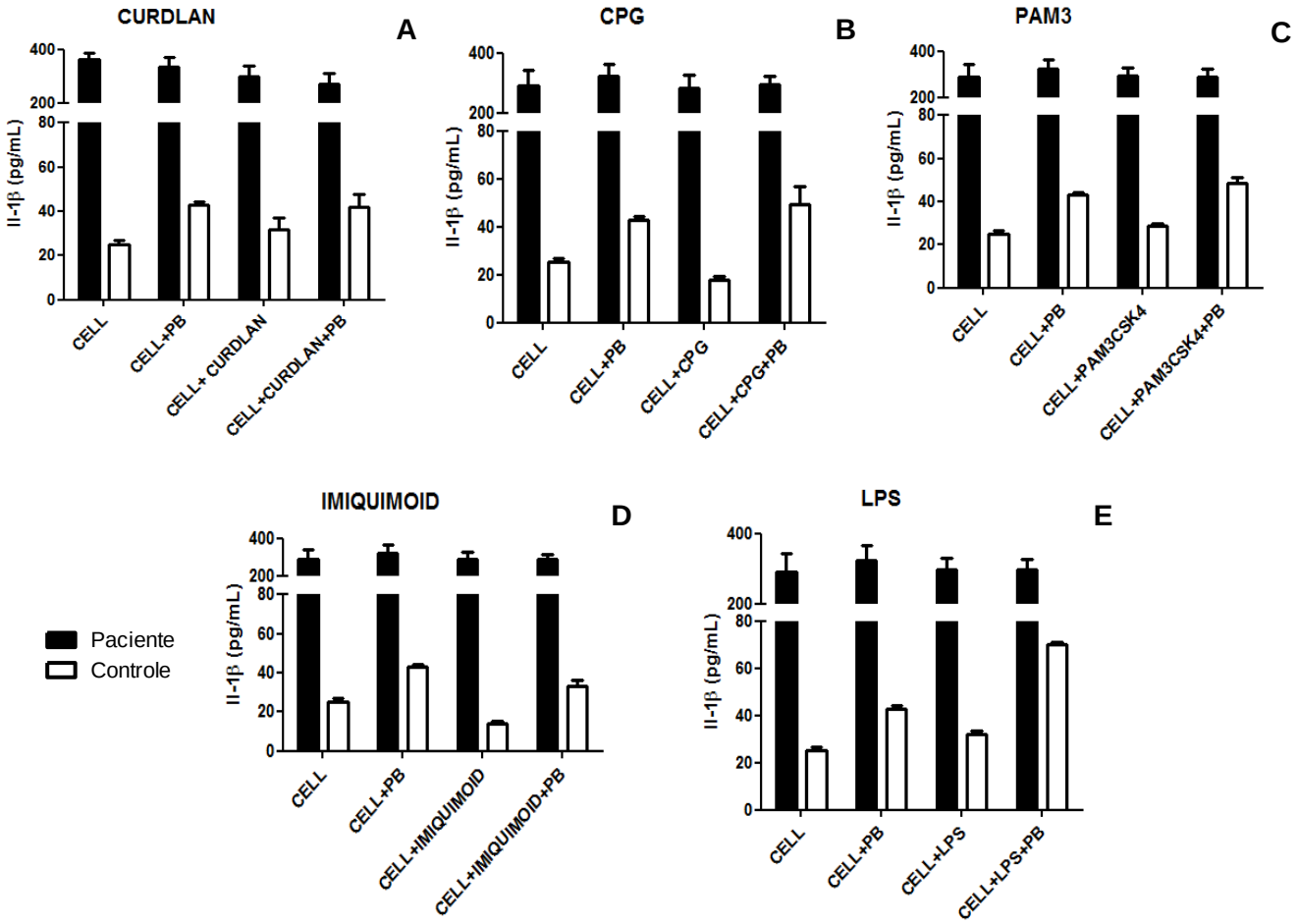

Figura 6: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e índividuos controle na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM ou Indivíduoscontrole (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. O sobrenadante do ensaio foi armazenado a -80 °C e as citocina foi dosada por métodos de ELISA. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de one-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (pg/ml para IL-1β) com desvio padrão da média

Houve um leve aumento, porém não significativo, da produção de IL-1β dos paciente controle quando ativadas com Curdlan e o fungo ao compararmos com a produção basal (figura 7A), vemos também aumentos significativos (p<0,05) da produção de IL-1β nas células de ínvido controle quando estimuladas com agonista e leveduras de Pb (figura 7B,7C,7E) e uma diminuição significativa da produção da citocina quando estimuladas com imiquimoid e leveduras de Pb em relação a células estimuladas com leveduras de Pb (figura 7D) .

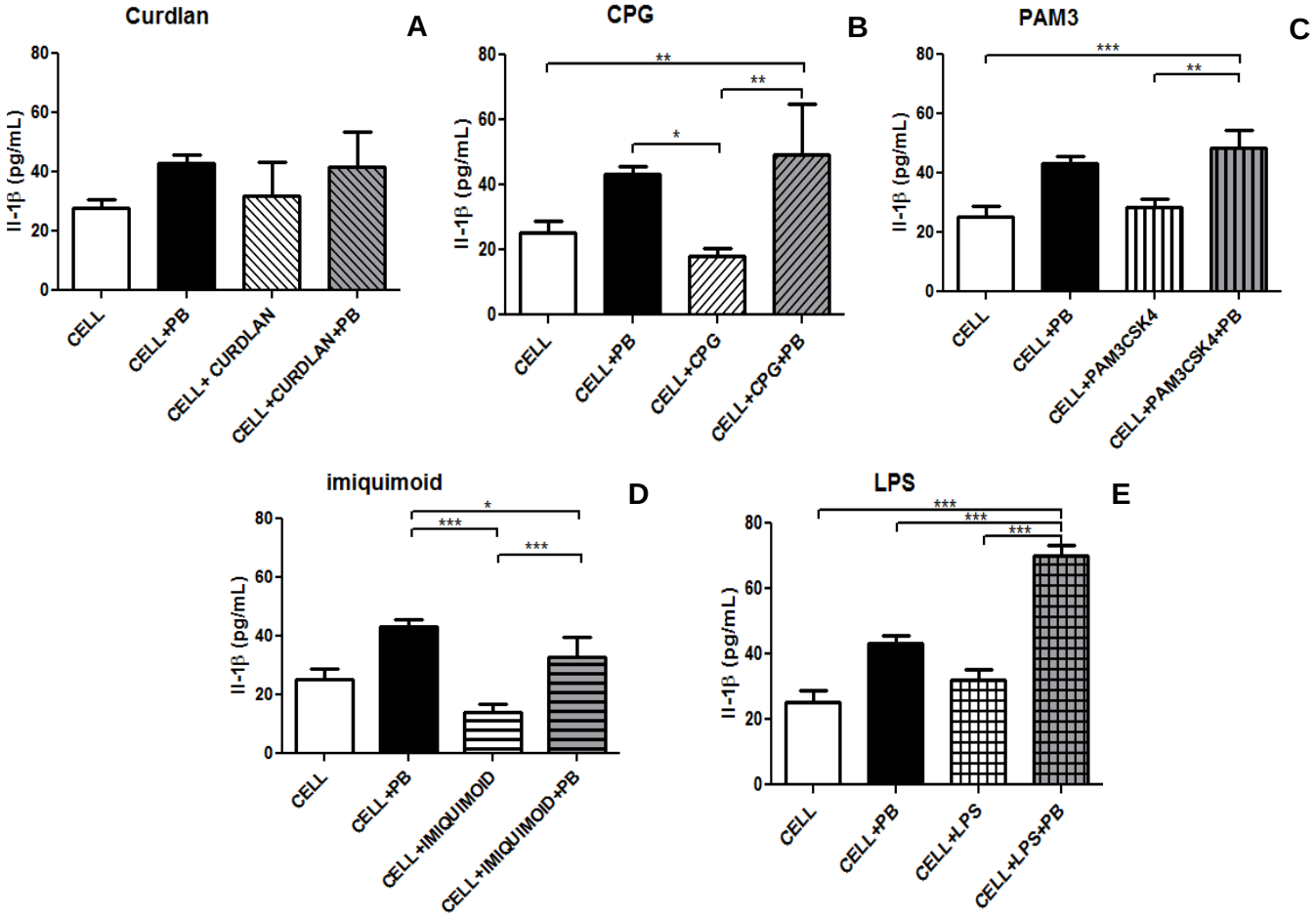

Figura 7: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controle na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. Células mononucleares de sangue periférico, de Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. O sobrenadante do ensaio foi armazenado a -80 °C e as citocina foi dosada por métodos de ELISA. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de one-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (pg/ml para IL-1β) com desvio padrão da média

Não foi possível observar alterações de produção de IL-1β nas células de pacientes com PCM estimuladas ou não com agonistas e leveduras de Pb, observou-se que as células desses pacientes têm uma produção muito mais elevada de IL-1β mesmo sem qualquer estimulo. (figura 8)

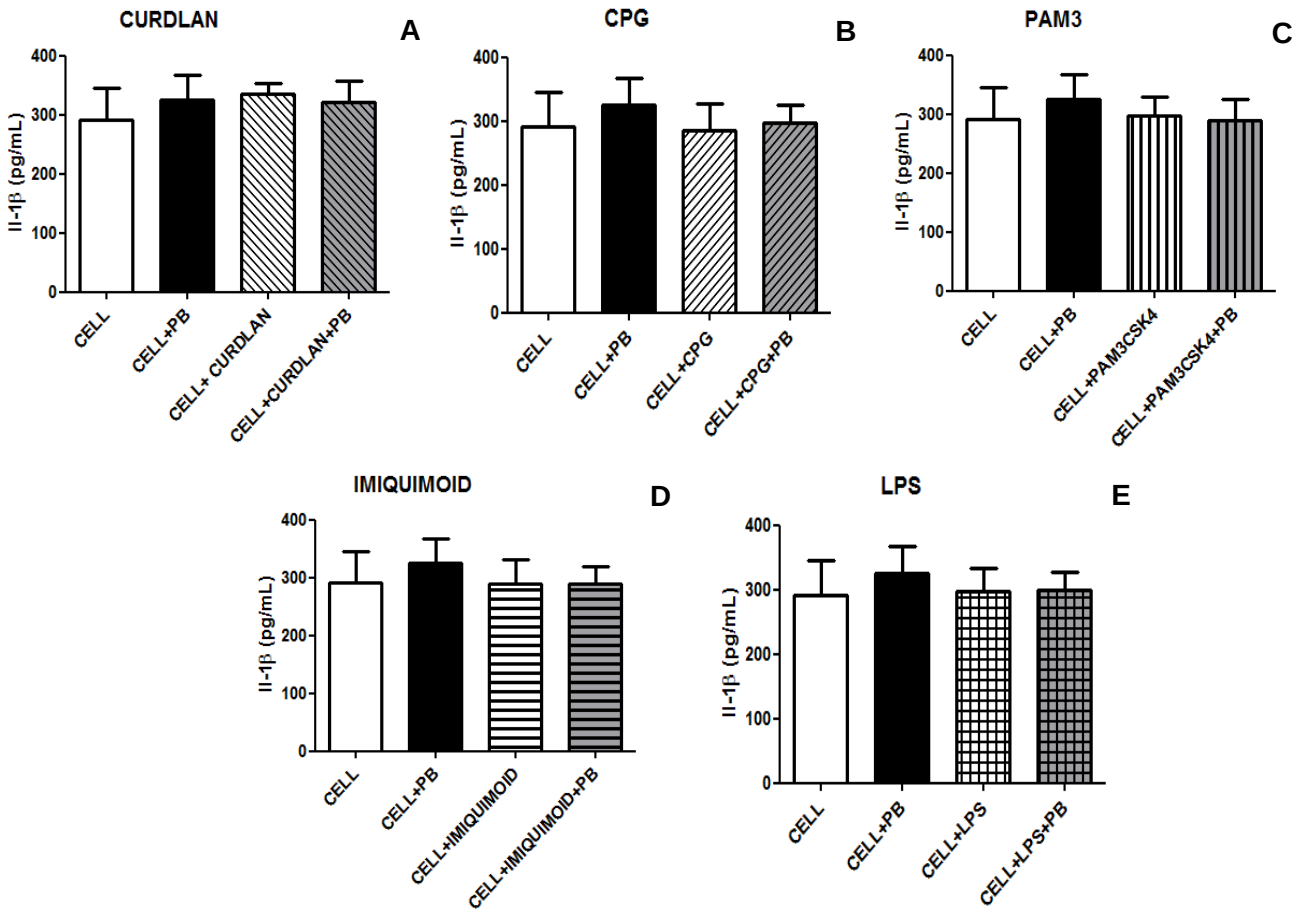

Figura 8: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. O sobrenadante do ensaio foi armazenado a -80 °C e as citocina foi dosada por métodos de ELISA. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de one-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (pg/ml para IL-1β) com desvio padrão da média

4.1.2. TNF-α

Foi possível observar uma maior produção, porém não significativa de TNF-α em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM ativados com Curdlan e LPS em relação aos Indivíduos controles (figura 9A, 9E), não foi possível observar alteração nos níveis de TNF-α quando estimulados com outros agonistas (figura 9B, 9C, 9D)

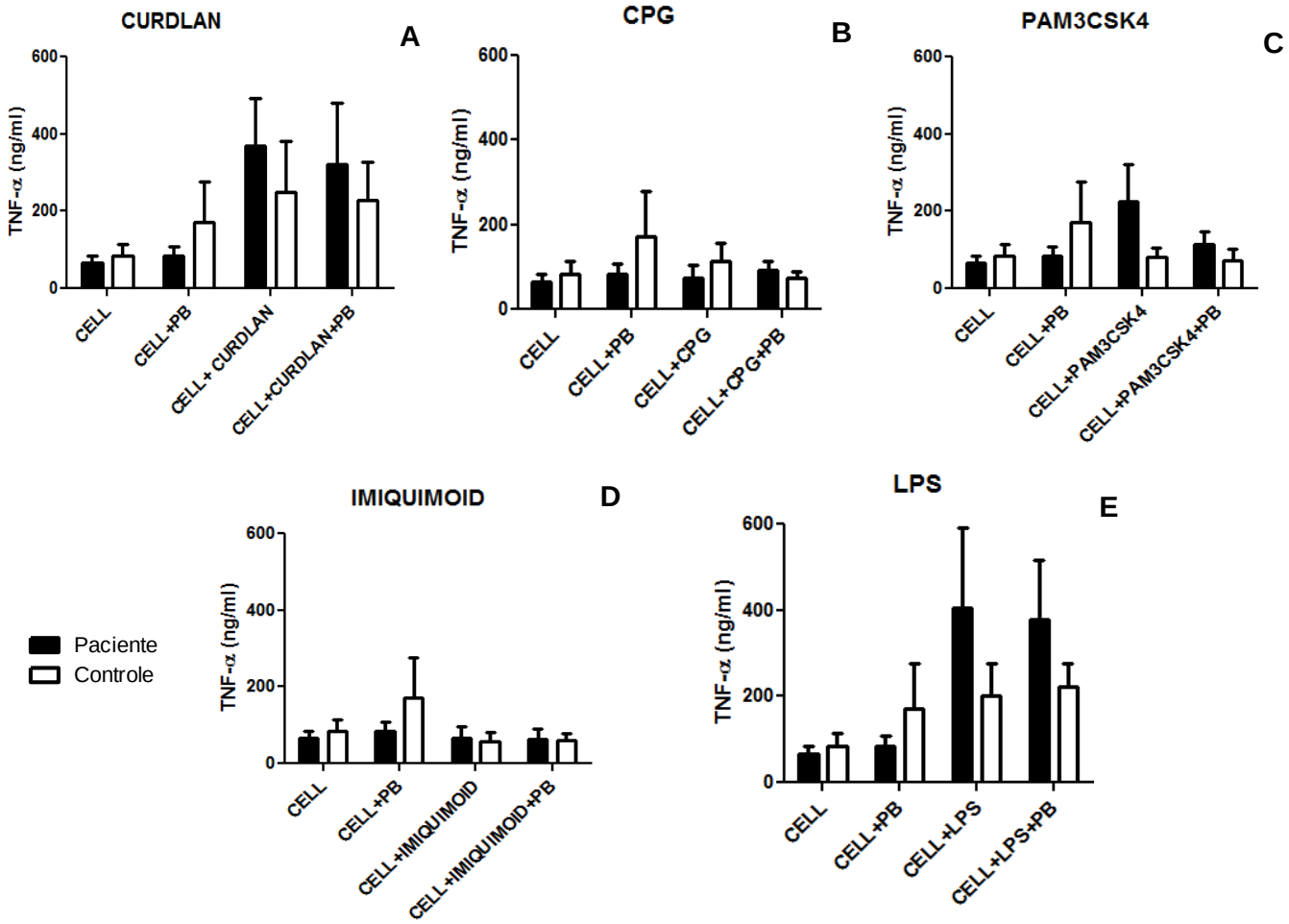

Figura 9: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM ou Indivíduos controles na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM ou Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. O sobrenadante do ensaio foi armazenado a -80 °C e as citocina foi dosada por métodos de ELISA. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de one-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (ng/ml para TNF-α) com desvio padrão da média

Ao analisarmos individualmente pacientes com PCM não é possível ver uma diferença significativa da produção de TNF-α, porem observamos uma maior produção de citocinas ao estimularmos com Curdlan e LPS (figura 10A, 10E).

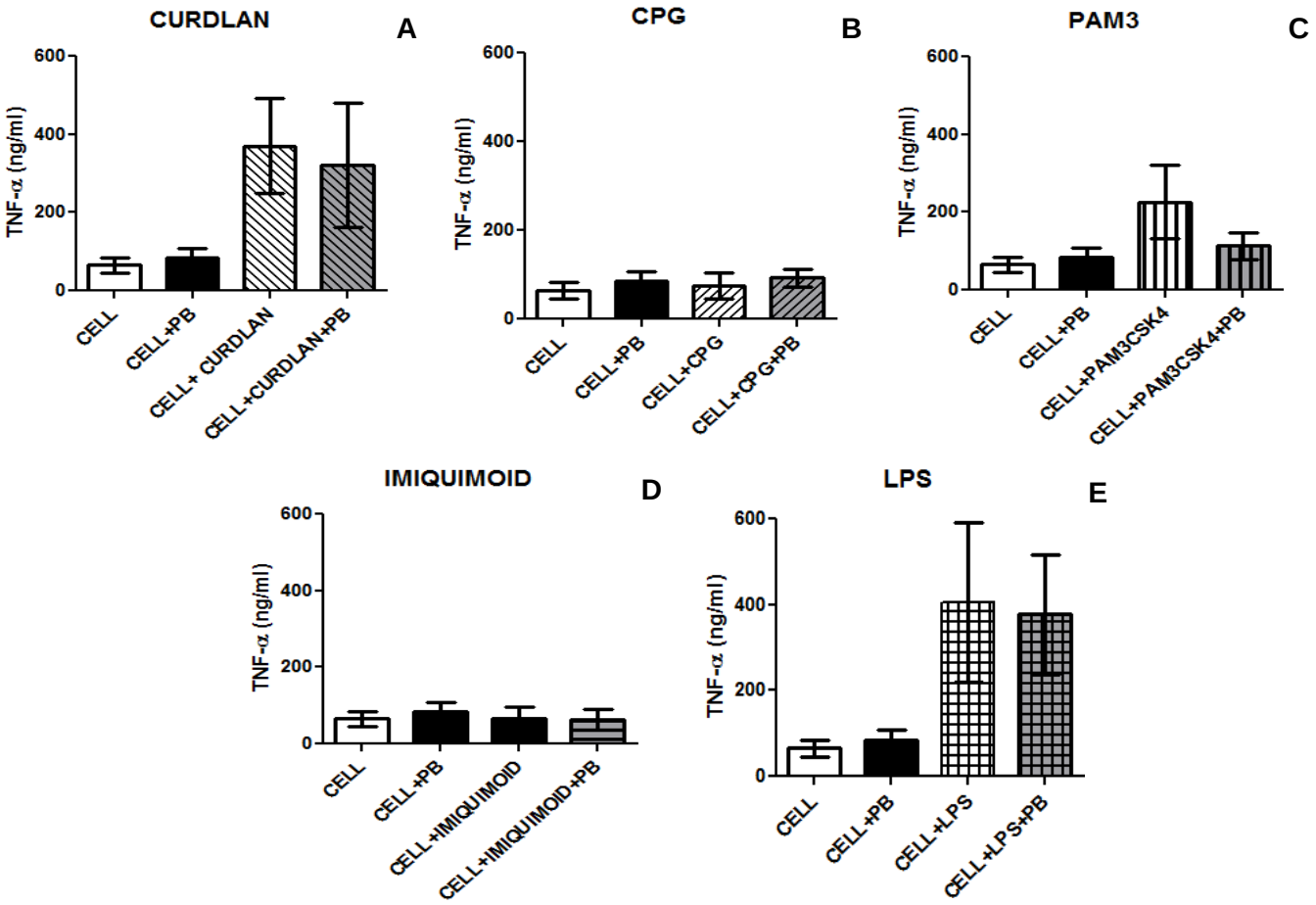

Figura 10: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. O sobrenadante do ensaio foi armazenado a -80 °C e as citocina foi dosada por métodos de ELISA. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de one-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (ng/ml para TNF-α) com desvio padrão da média

Em células mononucleares de sangue periférico de Indivíduoscontrole, não foi possível observar alterações significativas de produção de TNF-α mesmo quando estimuladas ou não com agonistas e leveduras de Pb (figura 11)

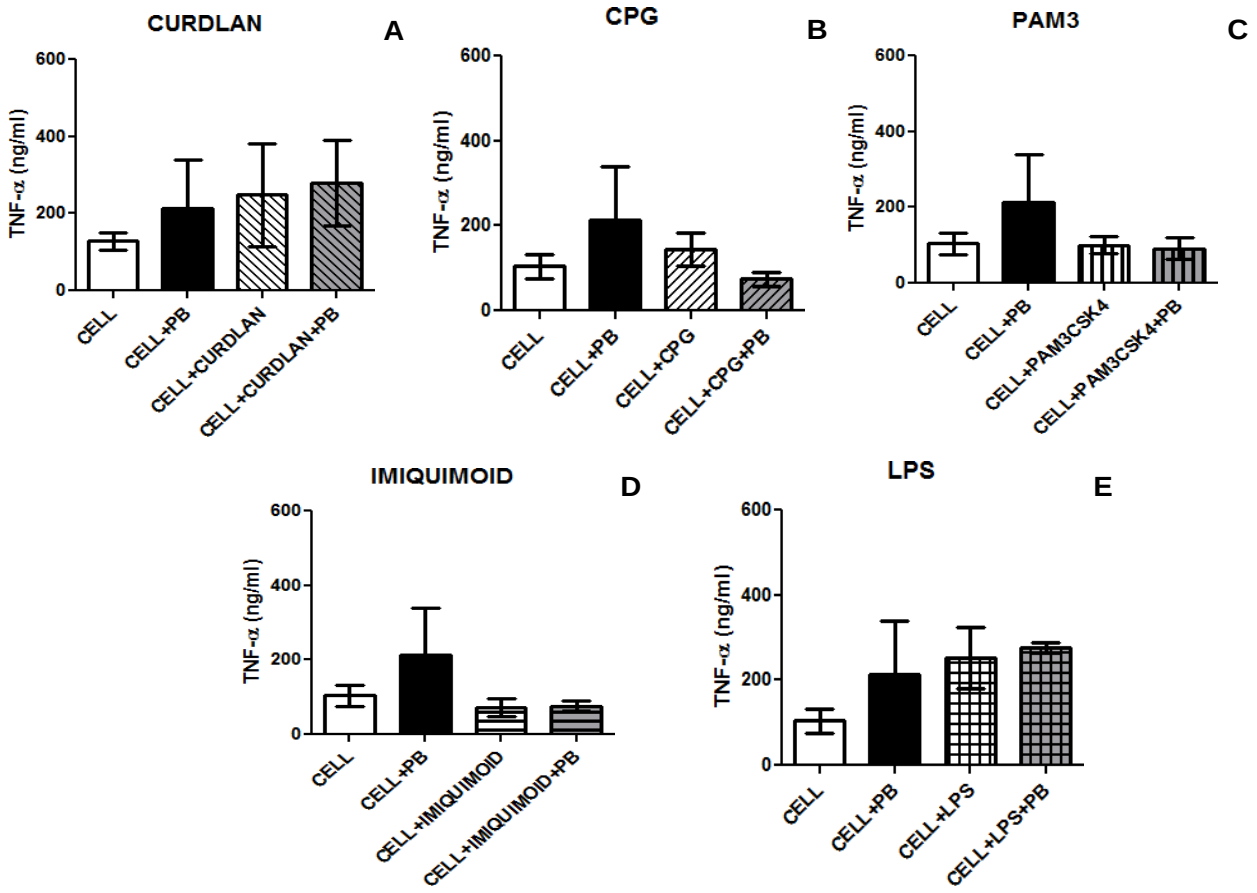

Figura 11: Perfil da secreção de citocinas após interação de 4h, entre células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controle na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18. Células mononucleares de sangue periférico, de Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. O sobrenadante do ensaio foi armazenado a -80 °C e as citocina foi dosada por métodos de ELISA. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de one-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (ng/ml para TNF-α) com desvio padrão da média

4.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A fim de elucidar melhor a importância dos PRR's na modulação da produção

de citocinas pró-inflamatórias principalmente a via de produção de, IL-1β, nós realizamos à análise da transcrição dos genes dos receptores: TLR-4, Dectina-1, do inflamassoma NALP-3, bem como outros fatores da via de produção de IL-1β como ASC, Caspase-1, Caspase-8. Não foi possível observar amplificação dos receptores TLR-4 e Dectina-1, inflamassoma NLRP3 e da molécula adaptadora ASC, já os níveis de Caspase 1 e Caspase-8 foram mesuráveis tanto em pacientes com PCM, quanto nos Indivíduos controles.

4.2.1. EXPRESSAO GENICA RELATIVA DE CASPASE 1

Na análise da transcrição relativa de caspase 1, quando comparamos pacientes com PCM e Pacientes controles observamos um aumento significativo ($P<0,05$) de transcritos de CASP-1, ao adicionarmos Curdlan e leveduras de Pb e Pam3csk4 e leveduras de Pb (figura 12A e 12C), também foi possível ver um aumento significativo ($P<0,05$) ao interagirmos os agonista Imiquimoid e LPS, com células de pacientes com PCM em relação aos Indivíduos controles, porém não oi possível ver esse aumento ao interagirmos os mesmos agonistas com leveduras de Pb.(figura 12D e 12E)

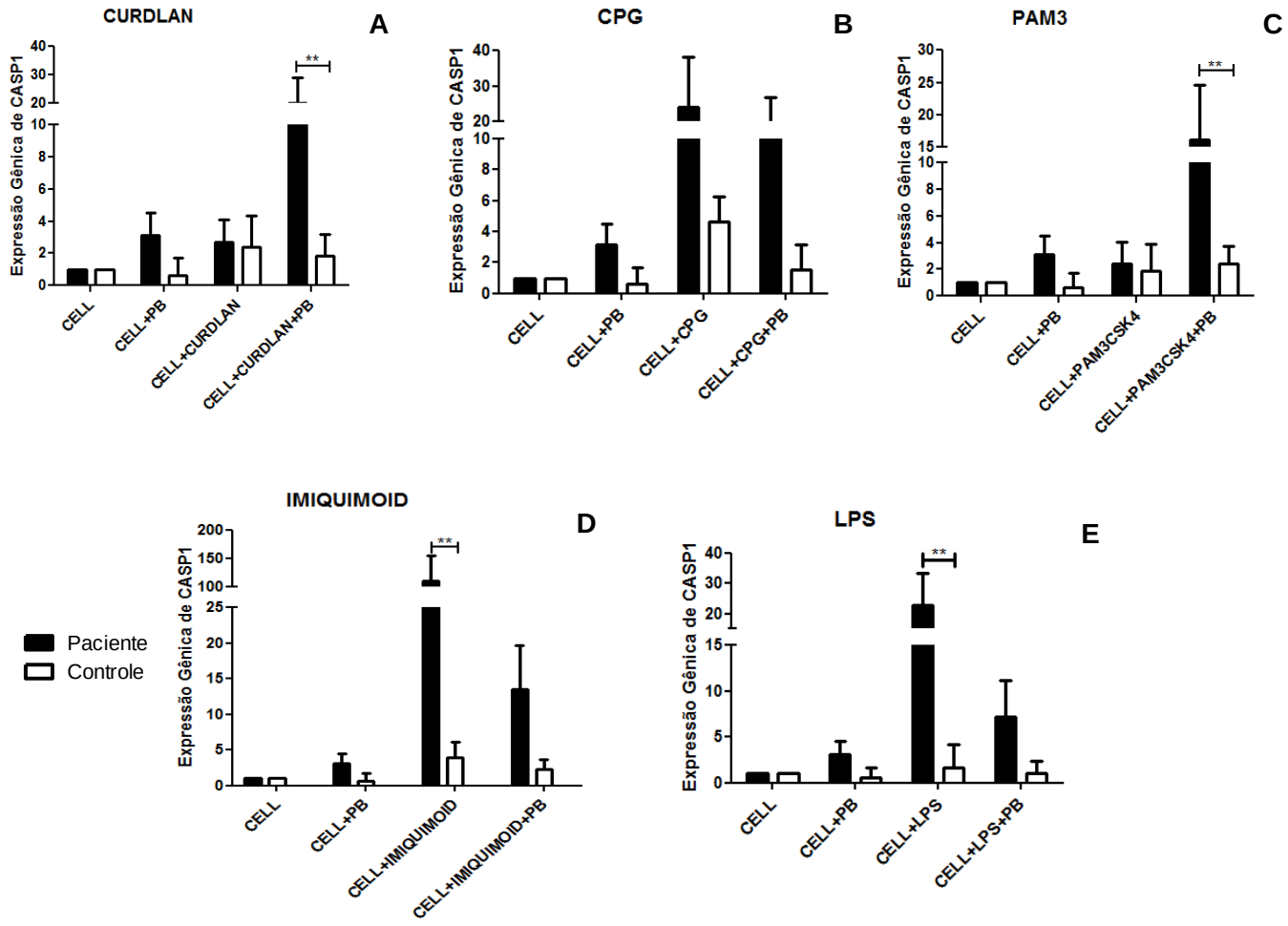

Figura 12: Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e Indivíduos controles, após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM ou Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear).

Ao analisarmos individualmente os Pacientes com PCM, nós observamos o mesmo aumento significativo (P<0,05) ao interagirmos as células com curdlan e fungo com relação às outras interações (figura 13A), também foi possível observar um aumento significativo (P<0,05) com relação às células estimuladas com Imiquimoid quando comparadas com as células estimuladas com leveduras de Pb (Figura 13D).

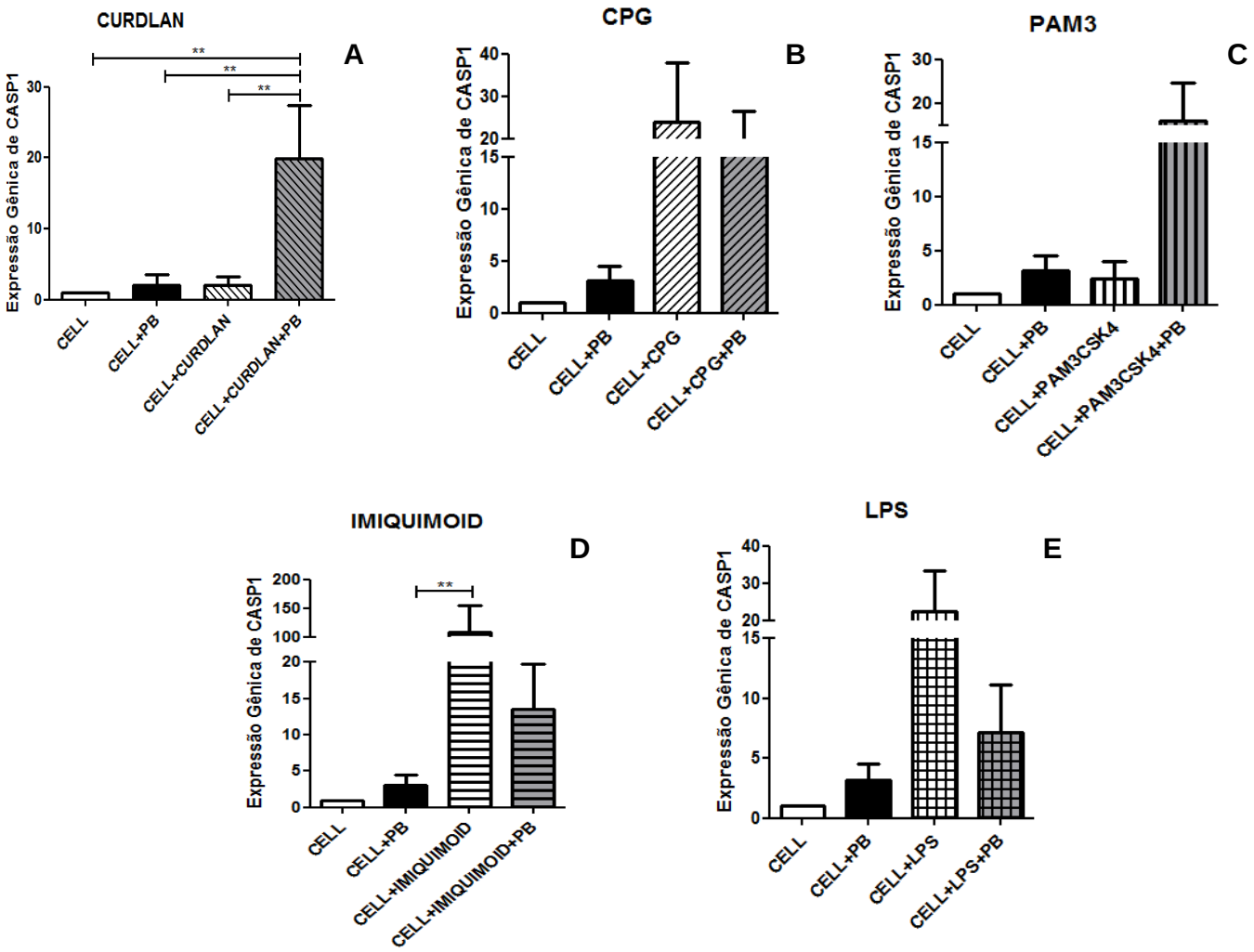

Figura 13 Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear).

Quando analisamos individualmente os Indivíduos controles não foi possível observar alterações significativas da expressão de caspase1 em nenhuma das situações (figura14)

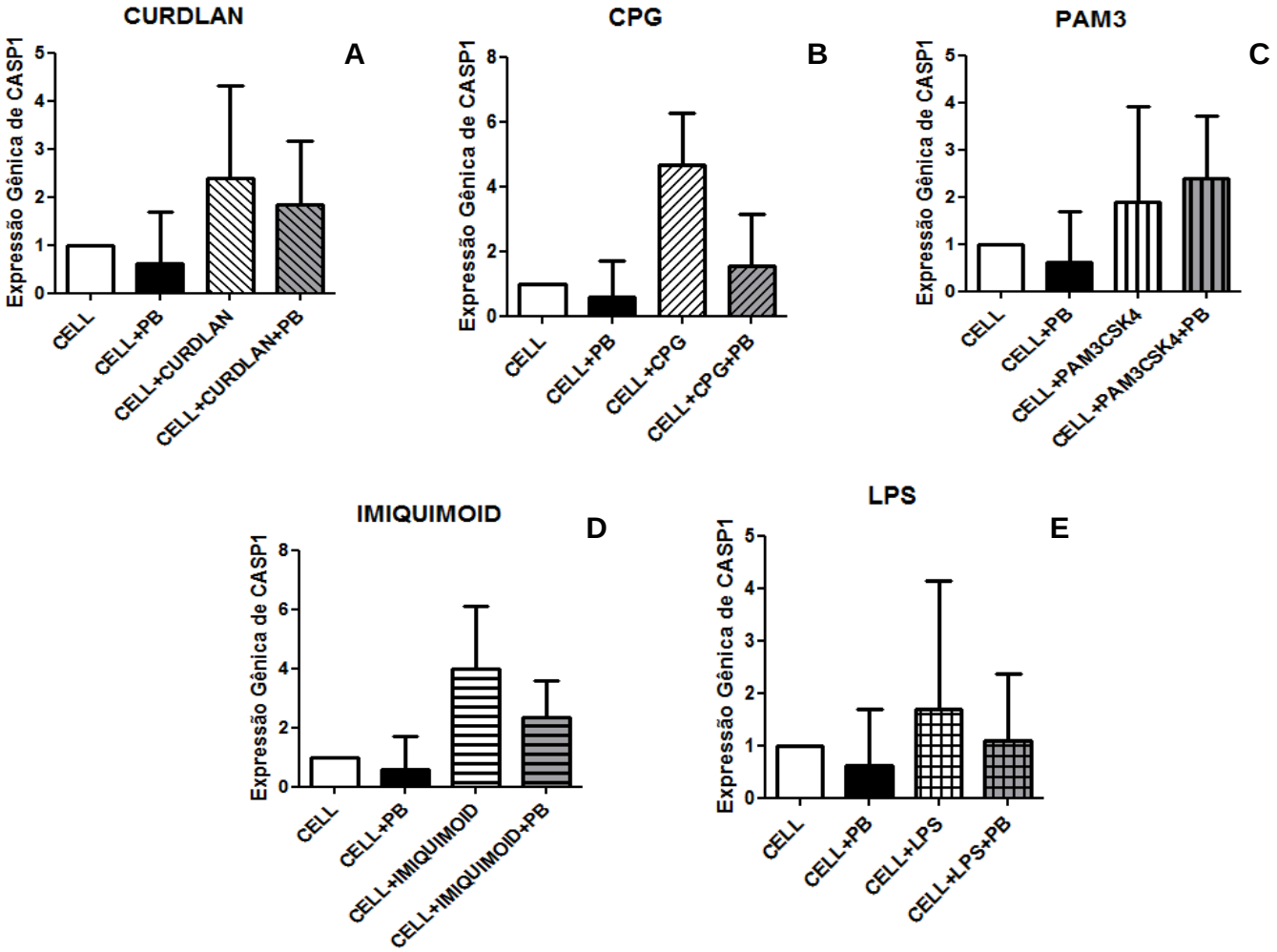

Figura 14 Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controle após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. Células mononucleares de sangue periférico, de Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear)

4.2.2. EXPRESSAO GENICA RELATIVA DE CASPASE 8

Na análise da transcrição relativa de caspase 8, quando comparamos pacientes com PCM e Indivíduos controles observamos um aumento significativo (P<0,05) de transcritos de caspase-8, ao adicionarmos Curdlan e leveduras de Pb (figura 15A), também foi possível ver um aumento significativo (P<0,05) ao interagirmos os agonista Imiquimoid e LPS, com células de pacientes com PCM em relação aos Indivíduos controles, porém não foi possível ver esse aumento ao interagirmos os mesmos

agonistas com leveduras de Pb.(figura 15D e 15E)

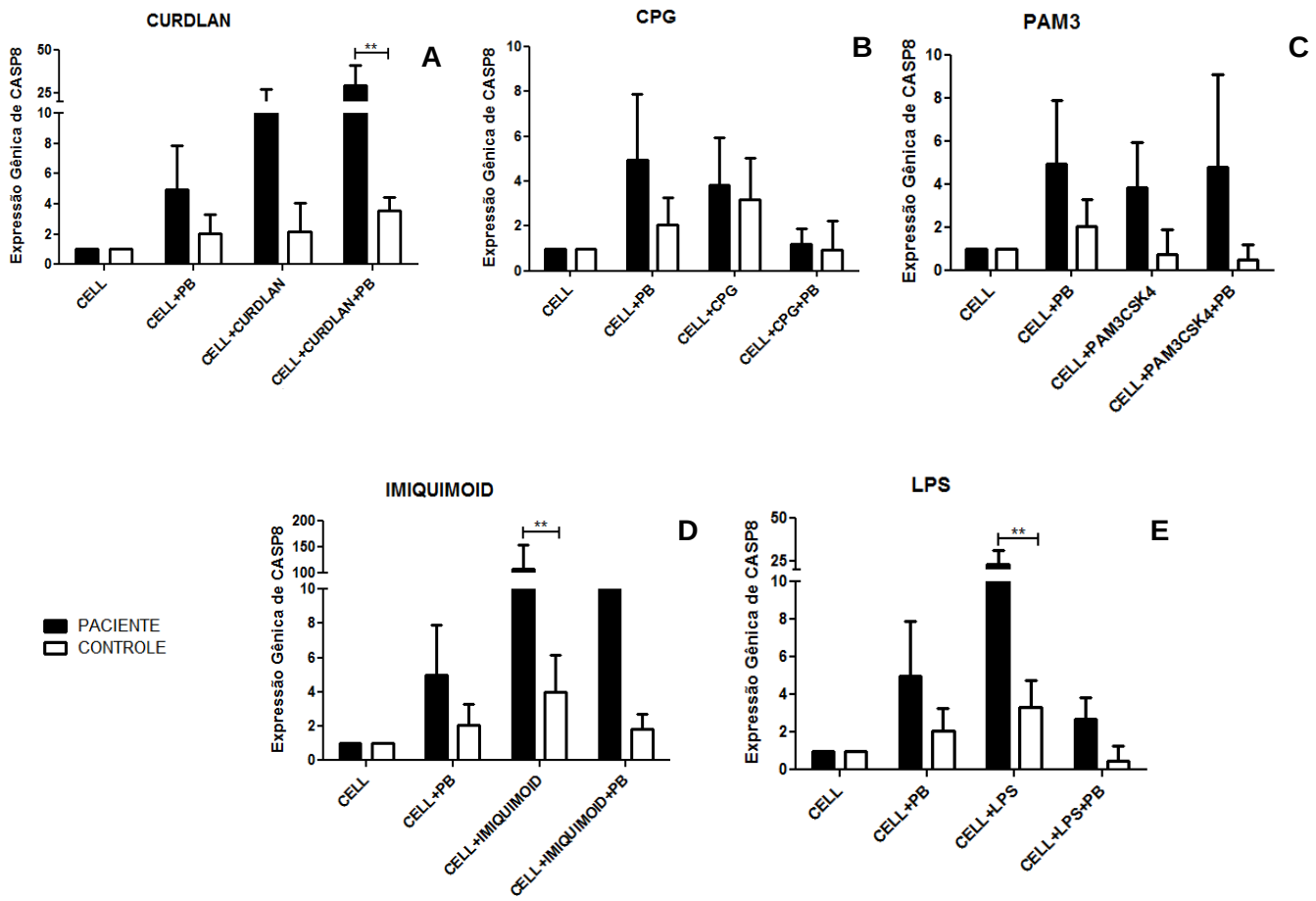

Figura 15 Análise transcricional de caspase 8 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM e Indivíduos controles, após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM ou Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear).

Ao analisarmos individualmente os Pacientes com PCM, nós observamos o mesmo aumento significativo (P<0,05) ao interagirmos as células com curdlan e fungo com relação às outras interações (figura 16A), também foi possível observar um aumento significativo (P<0,05) com relação às células estimuladas com Imiquimoid quando comparadas com as células estimuladas com leveduras de Pb e células estimuladas com Imiquimoid e leveduras de Pb (Figura 16D) e células estimuladas com

LPS apresentam um aumento significativo (p<0,05) quando comparadas com células estimuladas com o agonista e o fungo (figura 16E).

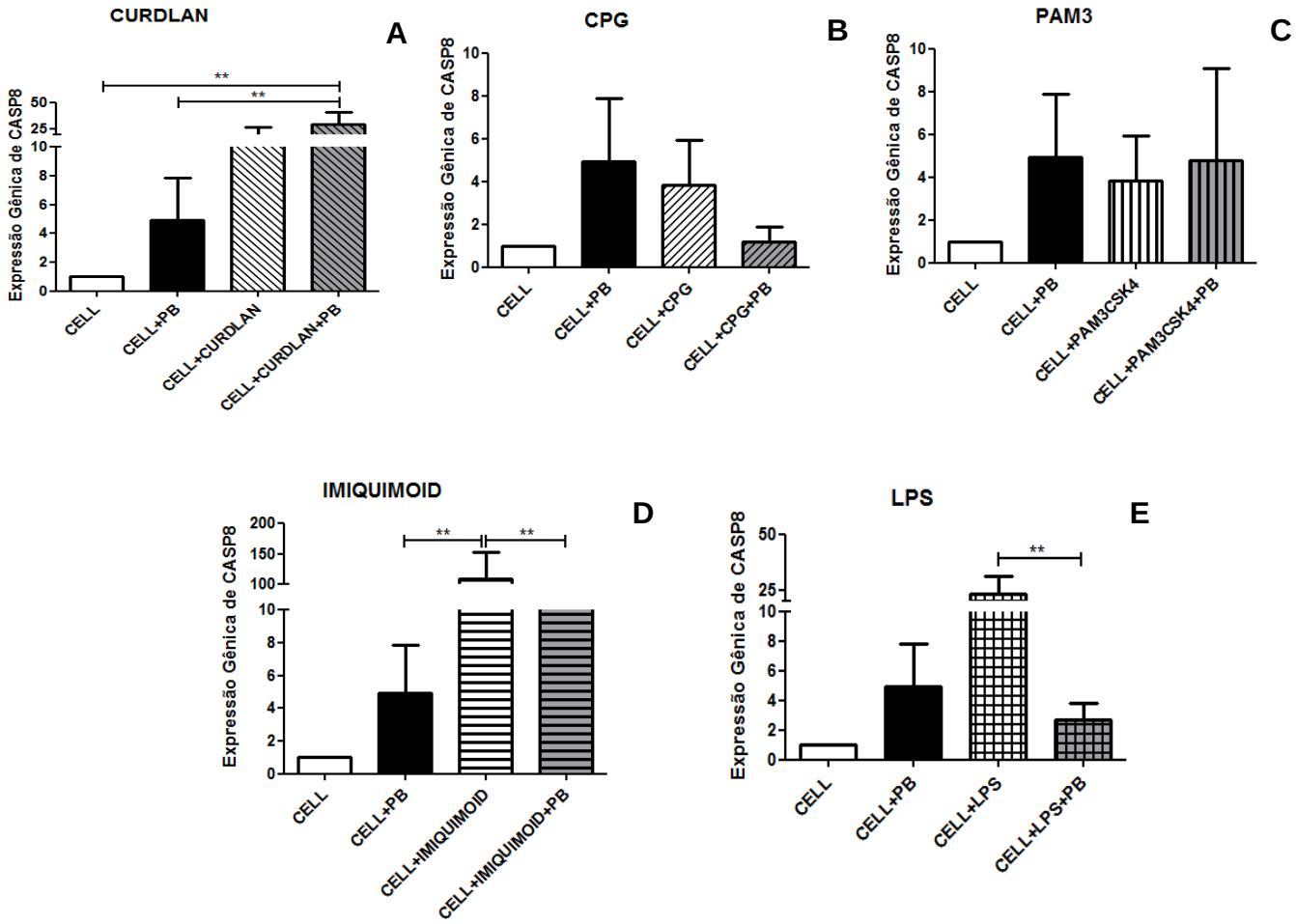

Figura 16 Análise transcricional de caspase 8 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. Células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com PCM (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear).

Quanto a análise individual dos Indivíduos controle não foi possível observar alterações significativas da expressão de caspase1 em nenhuma das situações (figura17).

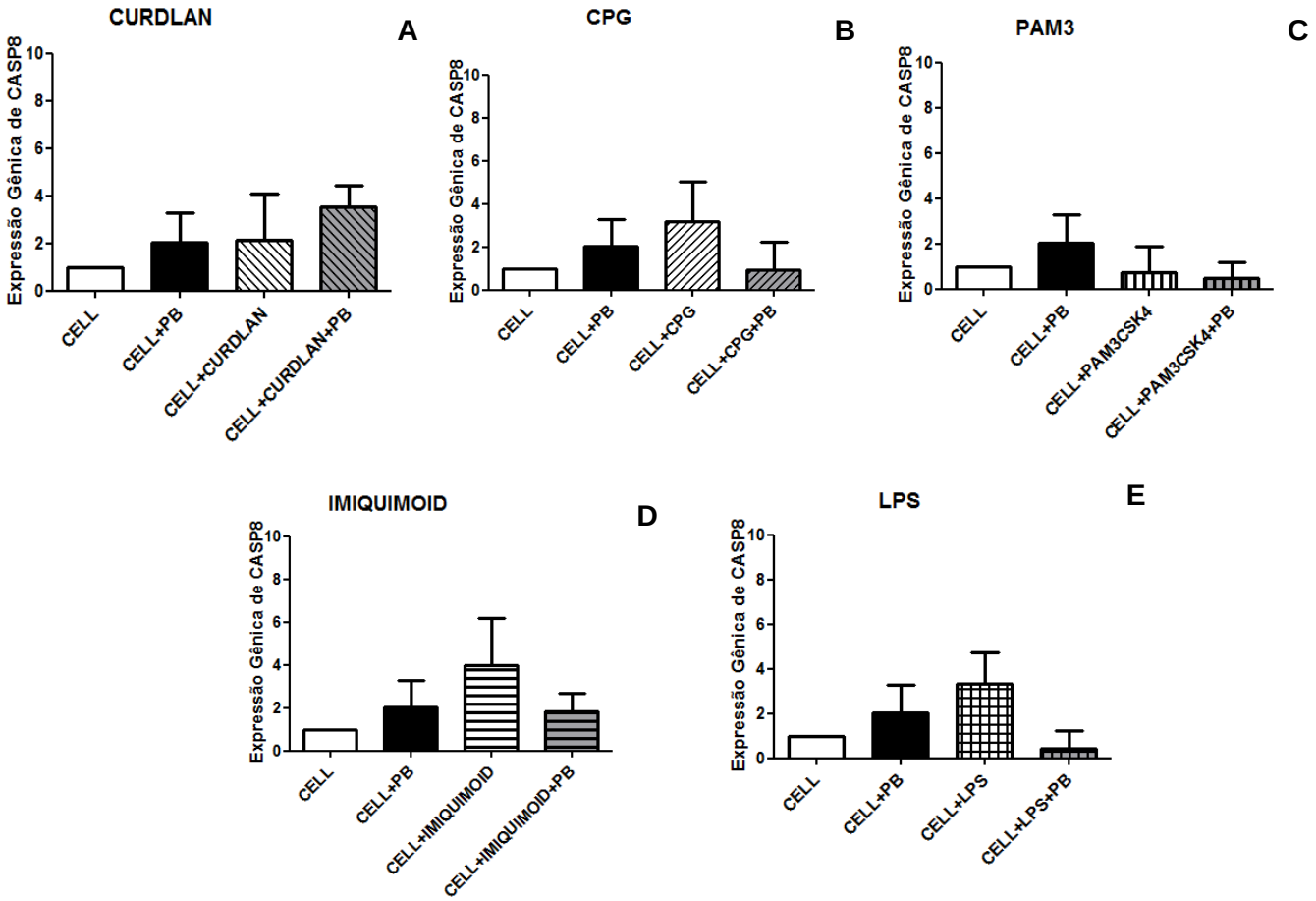

Figura 17 Análise transcricional de caspase 1 em células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controle após interação de 4h na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 e agonistas. Células mononucleares de sangue periférico, de Indivíduos controle (2 x 105cel/ poço) foram incubadas na presença ou ausência de leveduras da cepa Pb18 (1:1) e Curdlan (100 µg/ml), CPG (5 µM/ml) Pam3csk4 (10 ng/ml), Imiquimoid (1 µg/ml) e LPS (1 ng/ml) por 4 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear)

5. DISCUSSÃO

Em um processo infeccioso, os monócitos presentes no sangue periférico, são recrutados para o local da inflamação a fim de conter a disseminação do patógeno. No tecido, os monócitos se diferenciam em macrófagos os quais desenvolvem suas atividades microbicidas. Nos tecidos infectados, monócitos, macrófagos e células dendríticas atuam em conjunto para eliminar patógenos, produzindo fatores antimicrobianos, liberando citocinas pró-inflamatórias e promovendo resposta imune adaptativa. O recrutamento precoce dessas células é, portanto, essencial para a proteção eficaz do hospedeiro contra diversas infecções (revisado por Serbina, N. V et al 2008; Gordon, S. & Taylor 2005).

O TNF-α é um mediador da inflamação e resposta imune celular. Sua principal função é ativar monócitos e macrófagos, auxiliar na diferenciação dessas células e manutenção do granuloma, um mecanismo necessário para inibir a replicação de células fúngicas em PCM. (Figuereido et. al., 1993). Nossos resultados, evidenciam um aumento, porém não significativo da produção de TNF-α quando estimulada com Curdlan e LPS. Os altos níveis dessa citocina em modelos murinos de PCM estão relacionados a uma resposta Th1 protetora (Calich et.al.,1998). Recentemente Romagnolo e colaboradores em 2017, demonstraram um papel importante do receptor Dectina - 1 no reconhecimento de P. brasiliensis (Pb265), com produção de IL-12, IL-17A e TNF-α, contribuindo para um perfil resistente envolvendo resposta Th1 e Th17, corroborando com os nossos achados em relação as células estimuladas com curdlan.

Ao analisarmos o perfil de produção de IL-1β observamos que as células de pacientes com PCM apresentam uma produção basal da citocina aumentada mesmo sem estimulo, não alterando o perfil de produção mesmo quando estimuladas com os agonistas ou fungo, levando-nos a acreditar que os pacientes com PCM possuem uma produção contínua de IL-1β devido a ativação constante do inflamassoma durante a doença. Os inflamassomas auxiliam em orquestrar a resposta antifúngica do hospedeiro e durante os estágios posteriores da infecção fúngica potencializam as respostas Th17 e Th1 protetoras. O NLRP3, dentre os inflamassomas, é o melhor caracterizado em relação as infecções fúngicas. Tendo seu papel demonstrado em algumas infecções fúngicas por Candida albicans (GROSS et.al., 2009; HISE et.al., 2009), Aspergillus fumigatus (SAÏD-SADIER et.al., 2010) e Cryptococcus neoformans (Guo, C et.

al.,2014, Chen, M et.al., 2015) Bauernfeind e colaboradores em 2011, observaram que a produção da IL-1β está relacionada com a ativação dos inflamassomas e o recrutamento de caspase-1que ativa a clivagem de pro-IL-1β em IL-1β ativa. A IL-1β contribui para a defesa do hospedeiro contra a infecção aumentando as propriedades antimicrobianas dos fagócitos e auxilia em arquitetar a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T.

Pudemos observar também em nosso estudo um aumento da produção de IL1-β em células mononucleares de sangue periférico de Indivíduos controles quando estimulados com agonistas de TLR, principalmente quando ativamos essas células com LPS, corroborando com os dados de Neteae e colaboradores, que em 2009 demonstraram que monócitos humanos após estimulação com ligantes de TLR4 produzem IL-1β resultante da ativação da caspase-1 e ATP.

Sabe-se que a caspase-1 tem um papel importante na maturação da IL-1β, em nossos resultados, observamos um aumento da expressão gênica de caspase-1 nas células de pacientes com PCM e de Indivíduos controles, quando estimuladas com curdlan, levando-nos a acreditar na ativação do inflamassoma NLRP3 pelo receptor de Dectina-1. Em 2010 Kankkunen e colaboradores demonstraram que a ativação do inflamassoma NLRP3, pode ser realizada por meio da via de sinalização da dectina-1 / Syk, realizando as funções de PAMP e DAMP para desencadear a produção de IL-1β em macrófagos humanos. Na PCM um estudo de Tavares e colaboradores em 2013, demonstrou que células dendríticas e macrófagos, derivadas da medula óssea de camundongos, responderam à infecção por levedura de P. brasiliensis ativando a via clássica do NLRP3, isso mostra que a sinalização de IL-1β tem um papel importante na defesa de infecções fúngicas e na morte de leveduras de P. brasiliensis.

Em conjunto com o aumento da expressão genica de caspase-1 nós também observamos um aumento da expressão gênica de caspase-8 nas células de Pacientes com PCM. A caspase-8 desempenha um papel importante no processo de apoptose celular, alguns estudos identificaram novos papéis para a caspase-8 na modulação da IL-1β e inflamação, mostrando que a caspase-8 regula diretamente IL-1β independente de inflamassomas ou indiretamente através da ativação do mesmo, dependendo do estimulo que inicia a sinalização (Gurung et.al., 2015). Recentemente, foi demonstrado em monócitos humanos uma via não canônica da ativação de NLRP3, onde através de estímulos com ligantes de TLR4 a caspase-8 sinaliza a ativação da via clássica de NLRP3 (Gaidt M.M et al 2017). Alguns estudos vêm demonstrando um papel sinérgico

entre caspase-1 e caspase-8 dentro das infecções fúngicas por C. albicans e Aspergillus fumigatus, mediadas por dectina-1 e C3 (Ganesan et. al.,2014 Karki et. al., 2015), sugerindo que ambas as caspases são necessárias neste processo para a liberação de citocinas pró-inflamatória. Em contrapartida Chen, e colaboradores demonstraram que infecções por C. neoformans são capazes de ativar a via canônica do inflamassoma quando internalizado, porém, em células dendríticas deficientes de caspase-1 C. neoformans induziu uma alta secreção de IL-1β assim como morte celular, ambas sendo mediadas pela ativação não-canônica do inflamassoma. Esses achados revelam que a caspase-1 é inibitória para a caspase-8 em células dendríticas murinas na infecção por C. neoformans.

Analogamente a nossos resultados e a resultados anteriores com outras espécies fúngicas, Ketelut e colaboradores em 2018 revelaram um importante papel da caspase-8 na resposta imune inata na infecção por P. brasiliensis murina, demonstrando também sinergismo entre as vias não-canônicas e canônicas de produção de IL-1β durante a infecção fúngica. O mesmo autor, ainda demonstra uma via desconhecida (Caspase-8) para dectina-1 em células dendríticas infectadas por P. brasiliensis, onde a dectina-1 está conectada à clivagem pós-traducional de pró-IL-1β, mas também pode regular a transcrição de IL-1β mediada por NF-κB.

Ao longo do tempo, estudos vêm demonstrando a importância da modulação da resposta imune como meio de elucidar a interação dos PRRs com os patógenos e desenvolver novos métodos de abordagem terapêutica para as infecções fúngicas. Em nosso estudo fomos capazes de modular a resposta imune das células dos pacientes com PCM mesmo quando essas células já se encontravam em um estado de “exaustão celular”. Mostramos que quando ativamos o receptor de Dectina-1 com curdlan induzimos um aumento da expressão gênica de caspase-1 e caspase-8 e uma produção de IL-1β por uma via não canônica. A ativação de CLRs como a dectin-1 é importante para indução de uma resposta protetora Th1/Th17 uma vez que essas respostas são essenciais para a proteção contra infecções fúngicas (Hardison et. al., 2012). Nossos resultados demonstram a importância dos agonistas de PRRs na indução de uma resposta imune em células de pacientes com PCM, e propicia futuros estudos que visem identificar novas abordagens terapêuticas. Estudos recentes mostram que é possível modular esses receptores em pacientes com infecções fúngicas, como a utilização do agonista de TLR7, Imiquimoide, no tratamento de pacientes com cromoblatomicose

(Sousa et. al.,2014), e a utilização de β-glucanas junto ao tratamento da PCM (Meira et. al.,1996). Interessantemente, agonistas de CLRs podem também ser utilizados como estratégias de vacinação terapêutica (Huang et. al. 2010 Aouadi et. al. 2009), aumentando a antigenicidade e melhorando a resposta imune mediada pelas células do sistema imune.

6. CONCLUSÃO

Ao estudarmos a interação entre células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose, modulando a ativação de receptores de reconhecimento padrão por meio da interação destas células com leveduras de *P. brasiliensis* e agonistas de PRR, observamos que:

- Houve um aumento da expressão genica de caspase-1 e caspase-8 tanto em pacientes com PCM como em indivíduos controle.
- Ativação das células com curdlan induz uma via não canônica da produção da citocina IL-1β mesmo quando estas células se apresentam em um estado de exaustão.

Uma vez que curdlan é glucana linear com afinidade específica para dectina-1, podemos concluir que, o estimulo com curdlan em células de paciente mesmo com um alto nível de exaustão pode modular novamente a reposta para produção de citocinas e auxilia no desenvolvimento de novos estudos para identificar novos alvos e abordagens terapêuticas e desenvolvimento de possíveis vacinas na paracoccidioidomicose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADEREM, A., UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Ann Rev Immunol. 1999, 17: 593-623.

2. AHUJA, S.S., REDDICK, R.L., SATO, N., MONTALBO, E. KOSTECKI, V., ZHAO, W., DOLAN, M.J., MELBY, P.C. & AHUJA, S.K. Dendritic cell (DC)-based anti- infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. J. Immunol., 163: 3890-3897, 1999.

3. ALLEN, L.A.H., ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. Curr Opin Immunol. 1996, 8: 36-40.

4. ALMEIDA, S.R.; LOPES, J.D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to Paracoccidioides brasiliensis in inducing a TH1 response. Braz.J.Med.Biol.Res., 34(4), p. 529-37, 2001.

5. ANTHONY T.C.; McALEER R. Chromomycosis. Report of a case from West Austrália.Australas J. Dermatol. 7:13, 1963.

6.AOUADI M, TESZ GJ, NICOLORO SM, WANG M, CHOUINARD M, SOTO E, OSTROFF GR, CZECH MP. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. Nature. 2009 Apr 30

7. AUGER, M.J., ROSS, J.A. The Biology of macrophage. In The natural immune system: the macrophage. Oxford: IRL Press, 1992. cap. 1, p. 1-74.

8. BANCHEREAU J., STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392 (6673): 245-52, 1998.

9. BANCHEREAU J., BRIERE F., CAUX C., DAVOUST J., LEBECQUE S., LIU Y.J., PULENDRAN B., PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. Ann. Ver. Immunol. 18: 767-811, 2000.

10. BAUERNFEIND, F.; ABLASSER, A.; BARTOK, E.; KIM, S.; SCHMID-BURGK, J.; CAVLAR, T.; HORNUNG, V. Inflammasomes: Current understanding and open questions. Cell.Mol.LifeSci., 68(5), p. 765-83, 2011.

11. BLASI, E., PITZURRA, L., PULITI, M., CHIMIENTI, A.N., MAZZOLLA, R., BARLUZZI, R., BISTONI, F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of

Candida albicans to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. Infect Immun. 1995, 63(5): 1806-1809.

12. BRUMER, E., HANSON, L.H., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. Intracellular multiplication of Paracoccidioides brasiliensis in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activaded macrophages. Infect Immun. 1989, 57: 2289-2294.

13. BRUMER, E., MORRISON, C.J., STEVENS, D.A. Recombinant and natural gamma- interferon activation of macrophages in vitro: different dose requirements for induction of killing activity against phagocytizable and nonphagocytizable fungi. Infect Immun. 1985, 49(3): 724-730.

14. BRASCH, J. Current knowledge of host response in human tinea. Mycoses, 52, p.304- 12, 2009.

15. BRYANT, C.; FITZGERALD, K.A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. Trends Cell Biol., 19(9), p. 455-64, 2009

16. BRYDGES, S.D.; MUELLER,J.L.; MCGEOUGH, M.D.; PENA, C.A.; MISAGHI, A.; GANDHI, C.; PUTNAM, C.D.; BOYLE, D.L.; FIRESTEIN, G.S.; HORNER, A.A.; SOROOSH, P.; WATFORD, W.T.; O´SHEA, J.J.; KASTNER, D.L.; HOFFMAN, H.M. Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptative immunity. Immunity, 30(6), p.875-87, 2009

17. CARMO, J.P.M., DIAS-MELICIO, L.A., CALVI, S.A., PERAÇOLI, M.T.S., SOARES, M.V.C. TNF-α activates human monocytes for Paracoccidioides brasiliensis killing by an H2O2-dependent mechanism. Med Mycol. 2006, 44: 363-368.

18. CALICH VL, PINA A, FELONATO M, BERNARDINO S, COSTA TA, LOURES FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. Immunol Med Microbiol. v.53, p. 1-6, 2008. Review.

19. CHANDLER, F.W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases. London, Wolfe Med. Pub, 1980. P. 47-9.

20. CHENG, S.C.; VAN DE VEERDONK, F.L.; LENARDON, M.; STOFFELS, M.; PLANTINGA, T.; SMEEKENS, S.; RIZZETTO, L.; MUKAREMERA, L.; PREECHASUTH, K.; CAVALIERI, D.; KANNEGANTI, T.D.; VAN DE MEER, J.W.; KULLBERG, B.J.; JOOSTEN, L.A.; GOW, N.A.; NETEA, M.G. The dectin-

1/inflammasome pathway is responsible for the induction of the protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of Candida albicans. J.Leukoc.Biol., 90(2), p. 357-66, 2011.

21. CHU, J.; THOMAS, L.M.; WATKINS, S.C.; FRANCHI, L.; NÚÑEZ, G.; SALTER,R.D. Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1β from murine macrophages in a NALP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. J.Leukoc.Biol., 86(5), p.1227-38, 2009.

22. DAVIS, B.K.; WEN, H.; TING, J.P.Y. The inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. Annu. Rev. Immunol., 29, p. 707-35, 2011.

23. DE GROOT, P.W., HELLINGWERF, K.J., KLIS, F.M. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. Yeast. 2003, 20 (9): 781-96.

24 DE MATTOS GROSSO, D., ALMEIDA, S.R., MARIANO, M., LOPES, J.D. Characterization of gp70and anti-gp70 monoclonal antibodies in Paracoccidiodes brasiliensis pathogenesis. Infect Immun. 2003, 71 (11): 6534-6542.

DEEPE, G.S.JR. Immune response to early and late Histoplasma capsulatum infections.Curr Opin Microbiol. 2000, 3: 359-362

25. ESPOSITO-FARESE M.E., SAUTES, C., DE LA SALLE, H., LATOUR S., BIEBER, T., DE LA SALLE, C., OHLMANN, P., FRIDMAN, W.T., CAZENAVE, J.P., TEILLAUD, J.L. Membrane and soluble Fc gamma RII/RIII modulate the antigen-preseting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. J. Immunol. 155:1725-36, 1995.

26. FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FREED, P.W., WESTCOTT, J.Y., HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflamatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-β, PGE2 and PAF. J Clin Invest. 1998, 101 (4): 890-898.

27. FANGER, N.A., WARDWELL, K., SHEN, L., TEDDER, T.F., GUYRE, P.M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J. Immunol. 157:541-48, 1996.

28. FÈ d'OSTIANI, C., DEL SERO, G., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., SPRECA, A., MENCACCI, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., AND ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus Candida albicans:

implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. J. Exp. Med. 15:1661, 2000.

29. FENTON, M. J., GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. J. Leukoc. Biol. 64(1):25-32, 1998.

30. FLOHÉ, S.B., BAUER, C., FLOHÉ, S., AND MOLL, H. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite Leishmania major. Eur. J. Immunol. 28:3800-3811, 1998.

31. FANGER, N.A., WARDWELL, K., SHEN, L., TEDDER, T.F., GUYRE, P.M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J. Immunol. 157:541-48, 1996.

32. FENTON, M. J., GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. J. Leukoc. Biol. 64(1):25-32, 1998.

33. FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. Cell. Microbiol., 9(11), p. 2562-70, 2007.

34. FRANCO, M.V.; GOES, A.M.; KOURY, M.C. Model of in vitro granulomatous hipersensitivity in human paracoccidioidomycosis. Mycophatologia. 1997; 137 (3):129-

35. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003,

36. GORDON, S., TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2005, 5 (12): 953-964.

37. GORDON, S.B., Read, R.C. Macrophage defences against respiratory tract infections.British Medical Bulletin. 2002, 61: 45-61.

38. GREENBERG, S., GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. Curr Opin Immunol. 2002, 14: 136-145.

39. GROSS, O.; POECK, H.; BSCHEIDER,M.; DOSTERT, C.; HANNESSCHLÄGER, N.; ENDRESS,S.; HARTMANN, G.; TARDIVEL, A.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ,V.; MOCSAI, A.; TSCHOPP, J.; RULAND, J. Sky kinase signaling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. Nature,459(7542), p. 433-436, 2009.

40. GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITCOGEL, L., THÉRY, C., AND AMIGORENA, S. Antigen Presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Anu. Rev. Immunol. 20:621-67, 2002.

41. HAVLICKOCA, B.; CZAIKA, V.A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses, 51(4), p.2-15. 2008.

42. HISE, A.G.; TOMALKA, J.; GANESAN, S.; PATEL, K.; HALL, B.A.; BROWN, G.D.; FITZGERALD, K.A. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogenHenson, P.M., Hume, D.A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. Trends Immunol. 2006, 27: 244-250.

43. HUFFNAGLE, G.B., DEEPE, G.S.JR. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. Curr Opin Microbiol. 2003, 6: 344-350.

44. HUANG H, OSTROFF GR, LEE CK, SPECHT CA, LEVITZ SM. Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. MBio. 2010 Jul 20

45. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; DE BILVRE C.; CAMACHO-ARROYO I.; CERBON M.A.; DUONT B.; LOPEZ-MARTINEZ R. Sex hormone effects on Phialophora verrucosa in vitro an characterization of progesterone receptors. J. Med. Vet. Mycol. 33:235-239, 1995.

46. JONES, C.L.; WEISS, D.S. TLR signaling contributes to rapid inflammasome activation during F.novicida infection. PLoS One, 6(6), e20609, 2011.

47. KANKUNNEN, P.; TEIRILÄ, L.; RINTAHAKA, J.; ALENIUS, H.; WOLFF, H.; MATIKANEN, S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1and NLRP3 inflammasome in human macrophages. J.Immunol., 184(11), p.6335-42, 2010.

48. KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity, 34(5), p.637-50, 2011.

49. KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. Kuby Immunology, 6ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2007.

50. KINGETER, L.M.; LIN, X. C-type lectin receptor-induced NF-κB activatin in innate immune and inflammatory responses. Cell.Mol.Immunol., 9(2):105-12. doi: 10.1038/cmi.2011.58

51. KOLKER, E., HIGDON, R., HOGAN, J.M. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. Trends Microbiol. 2006, 14 (5): 229-235.

52. KUDEKEN, N., KAWAKAMI, K., SAITO, A. Different susceptibilities of yeasts and conidia of Penicillium marneffei to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activity of murine macrophages. Clin Exp Immunol. 1998, 112: 287-293.

53. KUGLER, S., SCHURTZ SEBGHATI, T., GROPPE EISSENBERG, L., GOLDMAN,W.E. Phenotypic variation and intracellular parasitism by Histoplasma capsulatum. Proc Natl Acad Sci USA. 2000, 97: 8794-8798.

54. KUMAR, H.; KUMAGAI, Y.; TSUCHIDA, T.; KOENIG, P.A.; SATOH, T.; GUO, Z.; JANG, M.H.; SAITOH, T.; AKIRA,S.; KAWAI, T. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate ant humoral adaptative immune responses to fungal β-glucan. J.Immunol., 183(12), p. 8061-7, 2009.

55. LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACARI, E.M., MELO, N. T. Tratado de micologia médica. 1 ed. SARVIER. 200236. LACAZ, C.S.; PORTO, E. HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico.,1.ed. São Paulo: Sarvier., 1998. P.232-237.

56. .LANZAVECCHIA A., SALLUSTO F. Dynamics os T lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells. Science 290 (5489): 92-7, 2000.

57. LANZAVECCHIA, A, SALLUSTO, F.: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cells. 106: 263-266, 2001.

58. LEE, H.M; YUK, J.M.; KIM, K.H.; JANG, J.; KANG, G.; PARK, J.B.; SON, J.W.;JO,

E.K. Mycobacterium abscessus activates the NLRP3 inflammasome via Dectin-1-SYK and p62/SQSTM1. Immunol.Cell.Biol., doi: 10.1038/icb.2011.72. 2011.

59. LEE, M.S.; KIM, L.J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annu.Rev.Biochem., 76, p. 447-80, 2007.

60. LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996. 86: 973-983.

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

62. LOURES, F.V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAÚJO, E.F; LEITE, K.R.M. and CALICH, V.L.G. Toll-Like Receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. Infection and Immunity, 2010, p. 1078-1088.

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

64. LOVCHIK, J.A., LYONS, C.R., LIPSCOMB, M.F. A role for γ interferon-induced nitric oxide in pulmonary clearance of Cryptococcus neoformans. Am J Respir Cell Mol Biol. 1995, 13: 116-124.

65. LOTZE, M.T. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. Ann. Surg., 226: 6-9, 1997.

66. MACMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997, 15: 323-350.

67. MAJOR, J., FLETCHER, J.E., HAMILTON, T.A. IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. J Immunol. 2002, 168: 2456-2463.

68. MANSOUR, M.K., LEVITZ, S.M. Interactions of fungi with phagocytes. Curr Opin Microbiol. 2003, 5 (4): 375-389.

69. MARIM, F.M.; SILVEIRA, T.N.; LIMA JR.; D.S.; ZAMBONI, D.S. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. PLoS One, 5(12), p. 1-8; 2010.

70. MARTINON, F; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. Inflammasomes: Guardians of the Body.Ann.Rev.Immunol., 27, p. 229-65, 2009.

71. MATUTE, D.R., MCEWEN, J.G., MONTES, B.A., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J.T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEGA, G., TAYLOR, J.W., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus Paracoccidioides brasiliensis as revealed by gene genealogies. Mol. Biol. Evol. 23, 65

72. MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of danger. Science, 296(5566), p. 301-5, 2002.

73. MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007, 449: 819-826

MEDZHITOV R, JANEWAY CA JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997 Oct 31;91(3):295-8. Review.

74. MENDEZ-TOVAR, L.J., LEMINI-LOPEZ, A., HERNANDEZ-HERNANDEZ, F., MANZANO-GAYOSSO, P., BLANCAS-ESPINOSA, R., LOPEZ-MARTINEZ, R. [Mycoses frequency in three communities in the North Mountain of the State of Puebla]. Gac Med Mex. 2003, 139 (2): 118-122.

75. MINAMI, P.S. Micologia – Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses, 1ed. São Paulo: Editora Manole, 2003.

76. MOLL, H., BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. Immunobiology. 204 (5): 659-66, 2001.

77. MÓCSAI, A.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V.L. The Syk tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. Nat.Rev.Immunol., 10(6), p. 387-402, 2010.

78. MUKHERJEE, S., LEE, S.C., CASADEVALL, A. Antibodies to Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages. Infect Immun. 1995, 63(2): 573-579.

79. NETEA, M.G.; SIMON, A.; VAN DE VEERDONK, F.; KULLBERG, B.J.; VAN DE MEER, J.W.; JOOSTEN, L.A. IL-1 beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. PLoS Pathogens, 6(2):e1000661, 2010.

80. PITARCH, A., SANCHEZ, M., NOMBELA, C., GIL, C. Analysis of the Candida albicans proteome. I- Strategies and applications. J Chromat. 2003, 787: 101-128.

81. RIVITTI, E.A., AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. Clin Dermatol.1999, 17 (2): 171-190.

82. ROMANI, L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol. 2004, 4: 1-13.

83. SCHRODER, K.; ZHOU, R.; TSCHOPP, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? Science, 327(5963), p. 296-300, 2010.

84. SHIBATA, Y., BERCLAZ, P.Y., CHRONEOS, Z.C., YOSHIDA, M., WHITSETT, J.A., TRAPNELL, B.C. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. Immunity. 2001, 15: 557-67.

85. SHIMADA, K.; ET.AL. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. Immunity, 36(3), p. 401-14, 2012.

86. SIMS, J.E.; SMITH, D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. Nat.Rev.Immunol., 10(2), p. 89-102, 2010.

87. STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu. Rev. Immunol., 9: 271-296, 1991.

88. STEINMAN, R.M. Dendritic cells and immune-based therapies. Exp. Hematol., 24: 859-863, 1996.

89. STOUT, R. D., SUTTLES, J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. Front Biosci. 1997, 2: d197-d206.

90. STOUT, R.D., SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. J Leukoc Biol. 2004, 76: 509-513.

91 SAÏD-SADIER, N.; PADILLA, E.; LANGSLEY, G.; OJCIUS, D.M. Aspergillus fumigatus Stimulates the NLRP3 Inflammasome through a Pathway Requiring ROS Production and the Syk Tyrosine Kinase. PLoS ONE, v.5, n.4, p. 1-10, 2010.

92. STRIENSTRA, R ET. AL. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. Cell Metab., 12 (6), p. 593-605, 2010.

93. SUZUKI, T.; FRANCHI, L.; TOMA C.; ASHIDA, H.; OGAWA, M.; YOSHIKAWA, Y.; MIMURO, H.; INOHARA, N.; SASAKAWA, C.; NUÑEZ, G. Differential Regulation of Caspase-1 Activation, Pyroptosis, and Autophagy via Ipaf and ASC in Shigella – Infected Macrophages. PLoS Pathog., 3(8), p.1082-91, 2007.

94. TAKAHASHI, K., NAITO, M., SHULTZ, L.D., HAYASHI, S., NISHIKAWA, S. Differentiation of dendritic cell populations in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice homozygous for the osteopetrosis (op) mutation. J Leukoc Biol. 1993, 53: 19-28.

95. TAYLOR, P.R., MARTINEZ-POMARES, L., STACEY, M., LIN, H.H., BROWN, G.D., GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. Ann Rev Immunol. 2005, 23: 901-944.

96. TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; DE CARVALHO, M.J.; et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol. Phylogenet. Evol. 2009, 52, 273–283.

97. THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.G.; ARAÚJO, J.P. Jr.; et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. Med. Mycol. 2005, 43, 725–729

98. TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-γ). Curr Opin Immunol. 1997, 9: 17-23.

99. TROMBETTA, E.S., MELLAMN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Ann Rev Immunol. 2005, 23: 975-1028.

100. TUCKER, S.C., CASADEVALL, A. Replication of Cryptococcus neoformans in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99: 3165-3170.

101. URBAN, B. C., AND ROBERTS, D. J. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infect erythrocytes switches off host cells. Curr. Opin. Immunol. 14:458-465, 2002.

102. UNANUE, E.R. & ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other acessory cells. Science, 236: 551-557, 1987.

103. UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action.Ann Rev Immunol. 2002, 20: 825-852.

104. VAN DE VEERDONK, F.L.; JOOSTEN, L.A.; SHAW, P.J.; SMEEKENS, S.P.; MALIREDDI, R.K.; VAN DE MEER, J.W.; KULLBERG, B.J.; NETEA, M.G.; KANNEGANTI, T.D. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. Eur.J.Immunol., 41(8), p. 2260-8, 2011.

105. WALKER, C.; SELBY, M.; ERIKSON, A.; CATALDO, D.; VALENSI, J.P.; van NEST, G.Cationics lipids direct a viral glycoprotein into the class I major histocompatibility complex antigen – presentation pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7915. 1992.

106. WASINGER, V.C., CORDWELL, S.J., CERPA-POLJAK, A., YAN, J.X., GOOLEY, A.A., WILKINS, M.R., DUNCAN, M.W., HARRIS, R., WILLIAMS, K.L., HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis. 1995, 16 (7): 1090-1094.

107. WICK, J.M. The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella.Immunology Letters. 85:99-102, 2003.

108. WHTIFIELD, N.N.; BYRNE, B.G.; SWANSON, M.S. Mouse macrophages are permissive to motile Legionella species that fails to trigger pyroptosis. Infect.Immun., 78(1), p. 423-32, 2009.

109 WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: Histoplasma capsulatum intracellular pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2003, 6: 327-331.

110. ZAMBETTI, L.P.; LAUDISI, F.; LICANDRO, G.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; MORTELLARO, A. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation … and a lot more. Immunol. Res., DOI 10.1007/s12026-012-8272-z, 2012

.