UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Análise da interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e
macrófagos através de receptores do tipo Notch

Lavínia Maria Dal'Mas Romera

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2012

Lavínia Maria Dal'Mas Romera

Análise da interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e
macrófagos através de receptores do tipo Notch

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, Julho de 2012.

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Carlos e Clivia, por sempre me apoiarem
ao longo do meu caminho.*

Agradecimentos

A Deus por me permitir hoje, concluir este trabalho e fazendo com que todos os dias que já se passaram e que virão sejam mais uma grande oportunidade de aprendizagem.

À minha família,

Aos meus pais, exemplo de vida e dedicação, por estarem sempre ao meu lado, seja nos momentos bons ou nos momentos ruins. Obrigada por todos os momentos da minha vida. Obrigada pela compreensão, pelas conversas, pela paciência, pelos abraços, pelo carinho. Obrigada pelo apoio e pela confiança. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu pai, pela força, inspiração e conselhos importantíssimos no decorrer deste trabalho. Obrigada pelas caronas até a estação de trem. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar quando necessário.

A minha mãe, pela ajuda, pelas conversas, pelos almoços, pela sua dedicação. Obrigada por ouvir minhas reclamações, minhas dúvidas, meus “surto”, minhas frustrações. Obrigada pela sua companhia hoje e sempre.

Ao meu irmão pelo carinho, alegria e compreensão. Obrigada por ser um irmão maravilhoso.

Aos meus avós, Mário e Norma e Antonio e Tercília. Agradeço a Deus por permitirem que vocês estejam comigo compartilhando esta conquista. Obrigada pelo apoio, mesmo distante. Obrigada por serem exemplos vivos de que é possível sonhar e realizar nossos sonhos. Obrigada por estarem em minha vida, mesmo distantes, sem vocês a vida não seria cor-de-rosa.

Ao meu avô Mário, que com certeza, foi uma fonte de inspiração para que eu pudesse chegar aonde cheguei.

A minha avó Norma, pela sua presença, seu apoio e seu carinho.

Aos meus avós Antonio e Tercília, que mesmo a gente não se vendo sempre, vocês sempre torceram por mim.

Aos meus amigos,

A minha amiga Telma Fátima Emídio Kimura, fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos momentos de risos, de conversas e de convívio. Obrigada pela ajuda, pela paciência (super paciência) com as minhas crises de raiva. Obrigada pela sua companhia nas longas horas de trânsitos sem fim nesta cidade, nas longas horas de experimentos no laboratório, nestes dois anos de pós-graduação. Obrigada pela sua amizade, pelo seu carinho, pelas suas palavras. Obrigada por estar ao meu lado sempre que necessário. Dizem que amigos são irmãos que escolhemos, então agradeço por você ser minha amiga.

A minha amiga Stephani Simião Araújo, uma super amiga. Na verdade, mais que uma amiga, uma irmã, afinal, 21 anos de amizade não tem preço. Obrigada pelos seus conselhos, suas sugestões, pelas nossas conversas. Obrigada por me apoiar nas decisões mais confusas. Mesmo longe, sei que posso contar com você sempre.

A minha amiga Ingrid Galo de Almeida Passos, pelas conversas, risadas, pelas várias indas ao cinema, pelas longas horas convívio. Obrigada por estar sempre ao meu lado, seja em qualquer situação. Obrigada pelos

momentos de descontração, por sempre ouvir minhas angústias e minhas reclamações. Obrigada pela sua longa amizade.

As minhas mais novas amigas, Grasielle Pereira Jannuzzi e Miriam Akie Kasai. Obrigada por me permitirem serem suas amigas. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos vários passeios na Av. Paulista, principalmente aos domingos. Obrigada pela companhia, pelas conversas, pelos momentos de risada, pelo carinho. Obrigada pelo convívio no laboratório, que com certeza tornou-se muito mais legal. Obrigada pela confiança e pela amizade.

Ao meu amigo Gilberto Hideo Kaihama pelo auxílio, pelos ensinamentos, pela paciência. Obrigada por sempre estar disposto a ajudar, a conversar e esclarecer inúmeras dúvidas. Obrigada pelas longas horas de convívio no laboratório. Obrigada pela sua atenção. Obrigada pela amizade.

Aos meus mais novos amigos, Fábio Seiti, José Roberto Fogaça de Almeida e Pollyanna Martins, que definitivamente tornaram as longas horas de experimentos muito mais alegres e divertidas.

Aos meus colegas do Laboratório de Micologia,

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, pela oportunidade de aprendizagem na realização deste trabalho. Obrigada pela confiança na realização deste trabalho e por acreditar na minha capacidade de desenvolvimento. Obrigada principalmente, por me orientar nestes dois anos.

A Prof. Dr^a. Karen Spadaro Ferreira pelos seus ensinamentos de conceitos, protocolos e fundamentos. Agradeço por todos os momentos de convívio, pela sua atenção durante todas as minhas dúvidas. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelas conversas.

As minhas companheiras e amigas do laboratório, Karla Letícia Santiago e Suelen Silvana dos Santos, por todo o auxílio, dedicação e paciência nas mais variadas dúvidas e durante a execução de diversos protocolos. Obrigada pelas conversas, pelos momentos alegres, pelas risadas e pela amizade.

A todos os amigos da Micologia, Grasielle Pereira Jannuzzi, Miriam Akie Kasai, José Roberto Fogaça de Almeida, Lucas Gonçalves Ferreira, Suelen Silvana dos Santos, Karla Letícia Santiago, Fábio Seiti, Pollyanna Martins e Telma Fátima Emídio Kimura. Muito obrigada por tornarem cada minuto mais do que especial, não podia pedir lugar melhor para trabalhar. Com certeza, em cada linha deste trabalho tem um pouquinho de todos os momentos que passei com vocês e de tudo o que vocês significam para mim.

À Sonia Regina Caramico Buratto, pela sua alegria, dedicação e auxílio sempre que necessário. Obrigada pelas nossas conversas, pelas risadas, pelo apoio e confiança. Obrigada por tornar os dias muito mais alegres e dinâmicos. Obrigada pelo seu carinho.

Aos meus colegas do Departamento de Análises Clínicas,

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia, Hadassa Cristina e Renée Oliveira, pelo companheirismo, pelo auxílio, pelas risadas e pelas conversas.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia pelo auxílio sempre que necessário.

A Renata Albuquerque, pelo auxílio e pela ajuda nos meus experimentos de citometria.

A Sueli, Edna e Ana Dantas pela paciência e pela ajuda nas questões burocráticas durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos os membros do departamento pelos valiosos ensinamentos e pela ajuda sempre que necessário.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de certa forma nesse trabalho, pelo apoio e pelo companheirismo.

Todas as ajudas são sempre imprescindíveis. Muito obrigada a todos!

*“O erro é simplesmente
a oportunidade para começar de novo,
desta vez de forma mais inteligente”*

Henry Ford

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica, no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

ROMERA, L.M.D. **Análise da interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* e macrófagos através de receptores do tipo Notch.** 2012. 100p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de natureza profunda e granulomatosa, que afeta preferencialmente o tecido pulmonar causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo que exibe dimorfismo térmico. O *P. brasiliensis* interage com células apresentadoras de antígenos (APCs), alterando suas principais funções biológicas. Entre as APCs, os macrófagos são células que desempenham um papel importante na indução e regulação da resposta imune e/ou inflamatória. São células do sistema fagocítico mononuclear que podem discriminar entre o que é próprio do organismo e os patógenos, através da expressão de receptores de reconhecimento padrão (PRR) que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), sendo células importantes no processo de fagocitose controlando o crescimento destes patógenos. Recentemente tem sido demonstrada a importância dos receptores Notch na regulação da atividade de macrófagos e do sistema imune. Os ligantes de Notch estão envolvidos nas locais inflamatórias de infecção devido ao aumento da expressão dos mesmos na superfície de células envolvidas neste processo. Considerando que a sinalização Notch pode estar envolvida na modulação da função de macrófagos, nós avaliamos se *P. brasiliensis* tem a capacidade de modular a ativação desta via e interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias. Para isso, macrófagos J774, pré-estimulados com LPS ou não, foram interagidos com leveduras do fungo, seguido por análise de PCR em tempo real e citometria de fluxo, dosagem de citocinas e índice de fagocitose. Nossos dados revelaram que na presença do fungo existe aumento dos níveis de transcrição do receptor Notch 1 e diminuição da transcrição do ligante Delta 4 em macrófagos pré-estimulados com LPS. Entretanto, verificamos que o fungo sozinho não é capaz de induzir a transcrição de NF- κ B, nem na presença do LPS, mas quando os macrófagos são estimulados com LPS e sofrem inibição da via de Notch existe aumento dos níveis de transcritos após interação com o fungo, sugerindo que esse fator é ativado na ausência de Notch. Nesse contexto de inibição de Notch, evidenciamos que a fagocitose de leveduras do fungo por macrófagos tornou-se mais eficiente, visto que houve aumento do índice de fagocitose na ausência de Notch. Foi possível verificar que o fungo tem a capacidade de promover a produção de IL-6 via TLR-Notch, fazendo-nos supor que essa citocina

seja importante para o estabelecimento da doença ao ser benéfica para o fungo e prejudicar o hospedeiro. E concomitantemente ao aumento de IL-6 existe diminuição da produção de TNF- α . Com base nesses resultados, podemos sugerir que o *P. brasiliensis* utiliza a via de sinalização Notch como um mecanismo de escape. A interação entre as leveduras do fungo e os macrófagos promove a ativação dessa via, através do receptor Notch 1, induzindo maior produção de IL-6, citocina importante para o crescimento do fungo no hospedeiro, conjuntamente com a diminuição de TNF- α prejudicando a atividade fungicida dos macrófagos.

Palavras Chaves: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, Macrófagos, Notch

Abstract

ROMERA, L.M.D. **Analysis of the interaction between *P. brasiliensis* and macrophages via Notch-type receptors**. 2012. 2012. 100p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis and deep granulomatous in nature, which affects mainly the lung tissue caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a fungus that exhibits thermal dimorphism. The *P. brasiliensis* interacts with antigen presenting cells (APCs), changing its main biological functions. Among the APCs, macrophages are cells that play an important role in the induction and regulation of the immune response and/or inflammatory response. They are cells of the mononuclear phagocytic system that can discriminate between what is characteristic of the organisms and pathogens, by expression of pattern recognition receptors (PRR) that recognizes the pathogen-associated molecular pattern (PAMPs), and are considered cells important in phagocytosis for controlling the growth of these pathogens. It has been recently demonstrated the importance of the Notch receptor in regulating the activity of macrophages and of the immune system. The ligands of Notch are involved in inflammatory sites of infection because there are increased expression of these ligands on cell surface involved in this process. Whereas the Notch signaling may be involved in modulating macrophage function, we evaluated whether *P. brasiliensis* has the ability to modulate the activation of this pathway and interfere with the production of pro-inflammatory cytokines. For this, J774 macrophages, pre-stimulated with LPS or not, are interacted with yeast fungus, followed by Real Time PCR analysis and flow cytometry, cytokine and phagocytosis index. Our data showed that the presence of the fungus exists increased levels of transcription of the Notch 1 receptor, and a decrease in ligand Delta 4 transcription on macrophages pre-stimulated with LPS. However, we found that the fungus itself is not able to induce transcription NF- κ B, even in the presence of LPS, but when macrophages are stimulated with LPS and suffer inhibition of the Notch signaling, exists increased levels of transcripts after interaction with the fungus, suggesting that this factor is activated in the absence of Notch. Within the context of inhibition of Notch, we found that phagocytosis of yeasts by macrophages become more efficient, since the increased rate of phagocytosis in the absence of Notch. It was verified that the fungus has the ability to promote the production of IL-6 via TLR-Notch, making us suppose that this cytokine is important for the establishment of the disease to be beneficial for the fungus and damage the host. And concurrently

with increased IL-6 there is decreased production of TNF- α . Based on these results, we suggest that *P. brasiliensis* uses the Notch signaling pathway as an escape mechanism. The interaction between the yeasts with macrophages promotes the activation of this pathway, by means of a Notch 1 receptor, inducing increased production of IL-6 cytokine important for the growth of fungus on host, together with a reduction of TNF- α , contributing with a damaging fungicidal activity of macrophages.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, macrophages, Notch

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celsius

ADAM - metaloproteases

AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome* (síndrome da imunodeficiência adquirida)

BSA – *bovine serum albumin* (albumina bovina sérica)

cDNA – DNA complementar

CT – *cycle threshold* (ciclo limiar)

DAPT – inibidor γ -secretase

DEPC - *Diethyl pyrocarbonate* (dietil pirocarbonato)

DII – Delta

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNase – desoxirribonuclease

dNTP - *Deoxyribonucleotide triphosphate* (trifosfato desoxirribonucleotídeo)

DTT – *Dithiothreitol* (ditiotreitól)

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

EtOH – álcool etílico

FITC – *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

g – força g

h - horas

Hes – *Hairy/enhancer of split* (potenciador de separação)

Hey – *hairy-related transcriptional factor*

IFN – Interferon

IL – Interleucina

iNOS – óxido sintase induzível

LPS – lipopolissacarídeo

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases* (proteína quinase ativada por mitógeno)

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MO - macrófagos

MOPS - 3 - (N-morfolino) propanossulfônico

NICD – *Intracellular Domain of Notch* (Domínio intracelular de Notch)

NLS – sinais de localização celular

NO – óxido nítrico

Oligo dT - *deoxy-thymine nucleotides* (nucleotídeos desoxi-timina)

PAMP – *Molecular Pattern of pathogen* (Padrão Molecular de Patógeno)

Pb18 – cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS – *Phosphate buffered saline* (Solução Salina de Fosfato Tamponada)

PBS – T - Solução Salina de Fosfato Tamponada com adição de 0,05% Tween 20)

PCM – Paracoccidioidomicose

PCR – *polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

PerCP – *peridinin-chlorophyll proteins* (proteínas peridinin clorofilas)

PI – Iodeto de propídio

PRR – *Receptor pattern recognition* (receptor de reconhecimento padrão)

PS - prenisilinas

qRT-PCR – reação de polimerase em cadeia em tempo real

R10 – RPMI com 10 % de SFB

RBP-J/CSL - *Recombining binding protein suppressor of hairless* (Supressor de proteína recombinante de ligação)

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

RPMI – meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute - 1640”

SFB – Soro Fetal Bovino

Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável

TGFβ - Fator de transformação do crescimento

Th – Linfócitos T *helper*

TLR – *Toll like receptor* (Receptores do tipo Toll)

TMB – tetrametilbenzidina

TNF-α – *Tumor necrosis factor* (Fator alfa de necrose tumoral)

V – voltagem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Célula leveduriforme do <i>P. brasiliensis</i>	23
Figura 2. Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose.....	24
Figura 3. Formação de granuloma maduro.	32
Figura 4. Processos Moleculares envolvidos na sinalização Notch.	38
Figura 5. Funções de Notch no desenvolvimento e diferenciação.	40
Figura 6. Fluxograma de metodologia aplicado nos experimentos.	48
Figura 7. Análise citométrica do receptor Notch 1 na superfície de macrófagos após interação com <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas.....	55
Figura 8. Detecção citométrica do receptor Notch 1 em macrófagos após interação com <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas.	56
Figura 9. Expressão de Notch 1 na superfície de macrófagos após interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas.....	56
Figura 10. Análise citométrica do ligante Delta 4 na superfície de macrófagos após interação com <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas.....	58
Figura 11. Detecção citométrica do ligante Delta 4 em macrófagos após interação com <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas.....	59
Figura 12. Expressão de Delta 4 na superfície de macrófagos após interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas.	59
Figura 13. Viabilidade de macrófagos após interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	60
Figura 14. Detecção citométrica da viabilidade de macrófagos após interação com <i>P. brasiliensis</i> por 4 horas.....	61
Figura 15. Detecção citométrica da viabilidade de macrófagos após interação com <i>P. brasiliensis</i> por 8 horas.	62
Figura 16. Análise transcricional do receptor Notch 1 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	63

Figura 17. Análise transcricional do ligante Delta 4 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	64
Figura 18. Análise transcricional de NF-kB em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	65
Figura 19. Análise transcricional de <i>hes 1</i> macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	66
Figura 20. Fagocitose de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos J774, observada por microscopia..	67
Figura 21. Fagocitose de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos J774 após inibição da via de Notch, observada por microscopia..	68
Figura 22. Índice de fagocitose de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos J774 após inibição da via de Notch, observada por microscopia.....	69
Figura 23. Perfil de secreção de IL-6 por macrófagos após interação de 4, 12 e 24 h com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> , na presença ou ausência de LPS/DAPT..	70
Figura 24. Perfil de secreção de TNF- α por macrófagos após interação de 4, 12 e 24 h com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> , na presença ou ausência de LPS/DAPT).....	71
Figura 25. Perfil de secreção de IL-10 por macrófagos após interação de 4, 12 e 24 h com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> , na presença ou ausência de LPS/DAPT.	72
Figura 26. Receptores Notch são expressos na superfície de células como proteínas heterodiméricas.	78
Figura 27. Ligantes de TLR ativam sinalização canônica de Notch.....	79

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Principais características clínicas, imunológicas e histopatológicas das formas aguda e crônica da paracoccidiodomicose.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. Fungo	46
3.2. Cultura de macrófagos da linhagem J774	46
3.3. Preparação do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	46
3.4. Interação de macrófagos J774 com <i>P. brasiliensis</i> para análise por RT-PCR	46
3.5. Interação de macrófagos J774 com <i>P. brasiliensis</i> para ELISA e Ensaio de Fagocitose	47
3.6. Interação de macrófagos J774 com <i>P. brasiliensis</i> para análise por Citometria de fluxo	47
3.7. Inibição da via de Notch	47
3.8. RT – PCR: Análise da expressão de RNAm de Notch 1 e Delta 4 em macrófagos J774 após interação com <i>P. brasiliensis</i>	49
3.8.1 Extração de RNA total	49
3.8.2 Quantificação do RNA total	49
3.8.3 Pureza do RNA total	49
3.8.4 Tratamento de RNA com DNase	50
3.8.5 Síntese de cDNA	50
3.8.6. PCR <i>em Tempo Real</i>	50
3.9. Ensaio de Fagocitose	51
3.10. Dosagem de citocinas (ELISA)	51
3.11. Marcação das células com anticorpos monoclonais contra Notch 1 e Delta 4	52
3.12. Ensaio de Viabilidade Celular	52
3.13. Análise estatística	52
4. RESULTADOS	54
4.1 Análise da expressão do receptor Notch 1 em macrófagos após interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	54
4.2 Análise da expressão do ligante Delta 4 na superfície de macrófagos após interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	57
4.3 Análise da viabilidade de macrófagos após interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por 4 e 8 horas	60

4.4	Análise transcricional do receptor Notch 1 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	63
4.5	Análise transcricional do ligante Delta 4 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	64
4.6	Análise transcricional de NF-kB em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	65
4.7	Análise transcricional de hes 1 macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	66
4.8	Ensaio de Fagocitose	67
4.8.1.	Fagocitose de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos.....	67
4.8.2.	Fagocitose após inibição da via de Notch, utilizando-se o inibidor farmacológico DAPT (inibidor γ -secretase), 24h antes da interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	68
4.8.3.	Índice de Fagocitose após inibição da via de Notch, utilizando-se o inibidor farmacológico DAPT (inibidor g-secretase), 24h antes da interação com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	69
4.9.	Dosagem de citocinas.....	70
4.9.1.	Dosagem de IL-6	70
4.9.2.	Dosagem de TNF- α	71
4.9.3.	Dosagem de IL-10	72
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONCLUSÃO.....	83
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Micoses sistêmicas consistem em infecções causadas por fungos patogênicos ou fungos com patogenicidade intrínseca baixa, que acaba sendo aumentada em pacientes imunocomprometidos, permitindo o estabelecimento da doença. Na maioria dos casos, o trato respiratório parece ser o primeiro sítio de entrada, conduzindo a infecção inicial nos pulmões; o fungo, então, é capaz de disseminar-se via linfo-hematogênica para outros órgãos. Essas doenças têm uma distribuição territorial restrita, devido à ocorrência geográfica limitada dos agentes etiológicos. Após penetrar no corpo humano, o fungo, geralmente, ativa o sistema de defesa; temos, assim, a infecção sem a doença, o que normalmente ocorre na paracoccidioidomicose (PCM), na coccidioidomicose, na histoplasmose e na criptococose. Nessas condições, a infecção é totalmente assintomática, ou com discretos sintomas, como febre, com ou sem nódulos; o estado infeccioso é detectado apenas por intermédio de resultados positivos de testes intradérmicos que utilizem os antígenos dos fungos. É comum observar o desenvolvimento da doença, nesses indivíduos, já decorridos vários anos após a infecção, devido à diminuição da resposta imune. Tal evento ocorre quando o paciente exposto ao fungo não vive mais nas áreas endêmicas, o que mascara o diagnóstico (RIVITTI; AOKI, 1999).

As micoses sistêmicas são responsáveis por problemas de saúde pública e econômicos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem demonstrando a importância do estudo das micoses tropicais e de seus impactos no mundo (LUPI et al., 2005). São consideradas um problema sério e crescente de saúde pública, além de constituírem uma importante causa de mortalidade e de morbidade em todo o planeta. Apesar de os estudos sobre os fungos responsáveis por essas micoses terem aumentado consideravelmente, sobretudo em razão das infecções oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos, os mencionados trabalhos privilegiam o enfoque nos fungos considerados de importância mundial. Provavelmente por esse motivo, fungos endêmicos, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, têm recebido muito menos atenção.

A paracoccidioidomicose foi descrita inicialmente em 1908, em São Paulo, capital do estado brasileiro homônimo, por Adolf Lutz (1855-1940), o qual publicou suas observações na revista "Brasil Médico". Nessa publicação, Lutz afirmava ter obtido o cultivo do parasito a partir de lesões observadas 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, 1982).

De 1908 até 1915, Alfonso Splendore estudou casos da PCM, caracterizou melhor as células fúngicas e sugeriu, em 1912, o nome *Zymonema brasiliensis* para o agente etiológico da paracoccidioidomicose (LACAZ, 1994). A moléstia passou, então, a ser denominada “blastomicose brasileira” e, logo após, “blastomicose sul-americana”, em decorrência dos casos observados em outros países da América do Sul. Outras sinonímias foram criadas, como: granulomatose blastomicoide neotropical, granuloma paracoccidioidico, adenomicose e doença de Lutz (LACAZ et. al., 1991). Em 1930, o médico Floriano Paulo de Almeida incluiu um novo gênero dentro do Reino Fungi – o *Paracoccidioides* –, revalidando a espécie *brasiliensis* descoberta anteriormente por Splendore. A partir de 1930, os estudos sobre a paracoccidioidomicose intensificaram-se, devido a vários fatores, como: os avanços da imunologia; o aparecimento de drogas para o tratamento da doença; e a descoberta do dimorfismo do fungo, o qual passou a ser analisado também por microscopia eletrônica – o que possibilitou melhor compreensão de sua biologia celular (LACAZ, 1994). O termo “paracoccidioidomicose” foi instituído em 1971, na reunião de micologistas das Américas, em Medellin (Colômbia), e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (VALLE; COSTA, 2001).

O agente etiológico da paracoccidioidomicose é o *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo dimórfico que sofre uma transição da forma miceliana para a forma de levedura a temperaturas de 24-26°C a 37°C, *in vitro* e em tecidos infectados. Esse processo de interconversão das mencionadas formas pode ser controlado *in vitro*, por alteração da temperatura de incubação (SAN BLAS, 1993; SAN BLAS et al., 2002). A temperatura, aliás, é definida como uma condição essencial para induzir ao dimorfismo (RESTREPO; JIMENEZ, 1980; SAN BLAS; SAN BLAS, 1985). Em meio mínimo, fatores nutricionais, como a presença de cisteína (enxofre orgânico) e compostos sulfídricos (β -mercaptoetanol), também são importantes durante esse processo de transição dimórfica (MEDOFF et al., 1987). As citadas características do *P. brasiliensis* o tornam um excelente modelo para a abordagem molecular do processo de diferenciação celular em fungos dimórficos.

A forma miceliana apresenta uma organização pluricelular formada por filamentos de células cilíndricas com ramificações, denominadas hifas; que por sua vez são multicelulares, finas e septadas, podendo apresentar esporos terminais ou intercalares. As células de levedura são multinucleadas, arredondadas e exibem múltiplos brotamentos, que conferem ao fungo uma estrutura típica, a qual tem

especial utilidade em seu diagnóstico. Tal estrutura foi denominada por Furtado e colaboradores (1967) de “roda de leme”. As mudanças morfológicas que acontecem na transformação de levedura para micélio são acompanhadas pela elongação dos brotamentos de levedura, evento que permite o desenvolvimento de uma hifa (SAN BLAS, 1985; SAN BLAS; SAN BLAS, 1985; SAN BLAS et al., 2002).

Figura 1. Célula leveduriforme do *P. brasiliensis*.Aparência de "roda de leme" da levedura do *P. brasiliensis* de cultura à 37°C, observada por microscopia com azul de lactofenol (Adatado de: CANO et al., 2012).

Segundo Lacaz (2002), a posição sistemática do *P. brasiliensis* é:

Reino	<i>Fungi</i>
Filo ou Divisão	<i>Eumycota</i>
Subdivisão	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Hyphomycetes</i>
Ordem	<i>Moniliales</i>
Família	<i>Moniliaceae</i>
Gênero	<i>Paracoccidioides</i>
Espécie	<i>brasiliensis</i>

A distribuição geográfica da enfermidade em questão está relacionada ao clima. A maioria dos casos ocorre em lugares com vegetações tropicais e subtropicais, onde solo é ácido, as temperaturas vão de 12 a 30°C e as altitudes variam de 150 a 2.000m e o índice pluviométrico é de 1.000-4.000 mm/ano (ALMEIDA, 1930; RIVITTI;

AOKI, 1999). A PCM é considerada uma micose restrita ao continente americano, particularmente aos países latino-americanos (GREER; RESTREPO, 1977), onde se distribui de forma heterogênea, mesmo nas áreas consideradas endêmicas (WANKE; LONDERO, 1994). A PCM ocorre na maioria dos citados países, com maior incidência no Brasil, na Venezuela, na Colômbia e na Argentina, conforme pode ser observado na figura 2.

Figura 2. Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose. (FRANCO et al., 1994).

A PCM causa significativo impacto socioeconômico nos países da América Latina, pois afeta trabalhadores rurais que ainda estão em seu período de vida produtivo (DEL NEGRO et al., 2000). Indivíduos que exercem atividades agrícolas constituem a maioria dos pacientes com a micose ativa; mas a infecção, antes quase totalmente restrita às áreas rurais, vem atingindo também zonas urbanas e acometendo profissionais em geral, mesmo aqueles que nunca saíram dos grandes centros (LACAZ, 1991). O tratamento é frequentemente longo e difícil, além de ser considerado de alto custo, sendo necessária a hospitalização dos pacientes. Sequelas também são comuns, muitas vezes causando disfunção pulmonar, sérias deformações dermatológicas e outras disfunções (FRANCO et al., 1994). O alto impacto da PCM na saúde pública deve-se aos custos sociais e econômicos causados. Estes últimos não decorrem apenas da doença em atividade, que afeta indivíduos em fase produtiva, mas também das frequentes sequelas secundárias dessa micose — motivo comum de incapacitação para o trabalho.

Os trabalhadores rurais são os mais atingidos, principalmente os que exercem atividades relacionadas à agricultura e ao solo (RESTREPO, 1985). No Uruguai, a

micose é reconhecida como uma doença tipicamente ocupacional e acomete apenas madeireiros (CONTI-DIAZ et al., 1989).

Blotta e colaboradores (1999) demonstraram que o Brasil é o país onde se registra o maior número de casos da PCM. A estimativa de incidência anual é de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes e observa-se uma significativa mortalidade — 0,14: 100.000 habitantes (LAZERA et al., 1998). No Brasil, há incidência em vários estados, que somam 80% dos casos conhecidos, a maioria dos quais descrita nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Embora se julgasse que a PCM fosse rara na Amazônia, testes realizados no Pará (1988) e em Rondônia (1994) mostraram alta prevalência da PCM nessas localidades, fato indicativo de que a região amazônica pode vir a ser uma importante zona endêmica. Simultaneamente, verificou-se o crescimento do número de pacientes diagnosticados com PCM na última década, no Hospital de Doenças Infecto-Contagiosas (HDIC) de Teresina, no estado de Piauí. Em dezembro de 1994, 115 casos de PCM foram diagnosticados no HDIC, e a Amazônia foi incluída como zona endêmica dessa micose. A ruralização, o desmatamento e o revolvimento do solo em regiões onde o fungo é nativo seriam as causas do aumento dos casos de PCM em determinadas localidades (WANKE, 1999).

A PCM que ocorre nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins, “colonizados” nas últimas décadas, apresenta uma peculiaridade interessante: a alta prevalência dos casos registrados em crianças. Os percentuais chegam a ser duas a três vezes maiores que os observados em outras regiões endêmicas do País. Isso ocorre em virtude de as crianças exercerem atividades em áreas limitadas e à permanência duradoura das famílias em tais regiões (FONSECA et al., 1999).

O Brasil é considerado centro endêmico e apresenta 80% dos casos relatados. Os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso são os mais afetados. Por atingir principalmente a população rural, a PCM é a oitava causa de morte no Brasil, se forem levadas em conta as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas. No Paraná, onde é diagnosticada em quase todo o estado, corresponde à quinta causa de óbitos por doenças dessa natureza. No mencionado estado, está registrada a maior taxa de mortalidade por PCM no Sul e no Sudeste (COUTINHO et al., 2002). Em áreas classificadas como altamente endêmicas, a razão de incidência anual da PCM é estimada em 3:100.000 habitantes (RESTREPO et al., 2001).

As maiores taxas de mortalidade por 1.000.000 de habitantes no Brasil são verificadas no Sul (2,59) e no Centro-Oeste (2,35), seguidas, em ordem decrescente,

pelas regiões Sudeste (1,81), Norte (1,06) e Nordeste (0,20). Os índices mais elevados são encontrados nos estados do Mato Grosso do Sul (4,39), de Rondônia (3,65), do Paraná (3,52) e do Mato Grosso (3,22) (COUTINHO et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2005).

A ausência de uma notificação compulsória dos casos de paracoccidioidomicose impede a existência de dados precisos sobre a gravidade da doença no Brasil. As informações disponíveis baseiam-se em relatos de inquéritos e de séries de casos. Testes de sensibilidade intradérmica com paracoccidioidina mostram níveis de cerca de 10% da população dos países mais afetados; outros dados estimam que a incidência anual em áreas endêmicas chegue a três novos casos para 100.000 habitantes. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; Coutinho et al., 2002; FAVA; NETTO, 1998; WANKE; LONDERO, 1994).

Em casos graves, a letalidade é estimada entre 2 e 23%, alcançando 30%, se associada à AIDS. Pela quantidade de mortes prematuras que provoca, principalmente em segmentos sociais específicos, como o dos trabalhadores rurais, a PCM representa um grave problema de saúde pública no Brasil. Entre 1985 e 2005, ocorreram 1.950 óbitos por PCM no estado de São Paulo (SANTO, 2008).

O habitat natural e a ecologia do *P. brasiliensis* ainda não estão definidos. Aceita-se que tais fungos dimórficos vivem saprofiticamente, em solos úmidos e detritos vegetais (NEVES, 1983; SOUTO et al., 2000). Ou seja, em locais ricos em proteínas e com variações mínimas na temperatura. Nesses lugares, o fungo cresce como micélio, produzindo conídios compatíveis com a dispersão aérea e que, uma vez inalados, penetram pelas vias respiratórias alojando-se nos alvéolos pulmonares (BORELLI, 1972). Sabe-se que o isolamento do *P. brasiliensis* do solo ou de vegetais é difícil; quando bem-sucedido, o reisolamento na mesma região torna-se ainda mais raro (FRANCO et al., 2000). No entanto, poucas tentativas tiveram sucesso nesse procedimento; acredita-se que a presença de fungicidas, herbicidas e inseticidas no solo das plantações interfira no isolamento do fungo (SILVA-VERGARA et al., 1998). Em 1986, o *P. brasiliensis* foi isolado em vísceras do tatu *Dasypus novemcinctus* (NAIFF et al., 1986). A partir desse momento, foram realizados vários isolamentos do fungo na espécie desse animal, em várias regiões endêmicas do Brasil (MARQUES, 2003).

O fungo foi isolado em tecidos de órgãos como fígado, baço e pulmão de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados em uma região de densa floresta tropical no Pará (NAIFF et al., 1986). Bagagli e colaboradores (1998) relataram elevada incidência de

PCM em tatus da mesma espécie, em áreas endêmicas de Botucatu (SP). O mesmo se deu Ibiá (MG) (VERGARA; MARTINEZ, 1999). Esses dados evidenciam que tatus dessa espécie são reservatórios naturais e hospedeiros silvestres do fungo. Borelli, em 1963, criou o termo *reservárea* para indicar o local exato onde o fungo vive. Quatorze *reserváreas* foram determinadas no Brasil (RESTREPO et al., 2001): Pará, Rondônia, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, visto que apresentam verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

A doença é mais comum em indivíduos do sexo masculino (80-90%) com idade entre 30 e 60 anos. Afeta principalmente trabalhadores do meio rural e indivíduos imunocomprometidos. Em mulheres e crianças, a incidência é menor, chegando a uma taxa homem/mulher de 78:1 casos (RESTREPO et al., 1984). Essa diferença parece estar relacionada a variações existentes no perfil hormonal de mulheres e homens (LOOSE et al., 1983). Nicol et al., em 1965, relataram uma das primeiras observações de que os indivíduos do sexo feminino seriam menos suscetíveis à PCM do que os do sexo oposto, provavelmente devido a fatores hormonais. Salazar et al. (1988), em um estudo *in vitro*, demonstraram que a administração de quantidades de estradiol acima das concentrações fisiológicas inibe a transformação de conídios em leveduras, isto é, a forma infectante na forma parasitária. De acordo com Stover et al. (1986), há proteína do citoplasma do fungo, em ambas as fases de desenvolvimento, que se liga às do estrogênio, podendo ser considerada um provável receptor desse hormônio. Restrepo et al. (1984) mostraram que o hormônio feminino β -estradiol inibe a transição de micélio para levedura *in vitro*, sugerindo um papel protetor desse hormônio. Aristizabal et al. (1998; 2002) infectaram camundongos machos e fêmeas com *P. brasiliensis* e mostraram que, nos animais de ambos os sexos tratados com β -estradiol, a transição de micélio para levedura não ocorreu. Esses resultados reforçam o papel do estradiol na resistência das fêmeas à infecção.

O diagnóstico da PCM é realizado por métodos diretos e indiretos (diagnóstico sorológico). Os métodos diretos incluem exames microscópicos de espécimes biológicos do paciente (biópsia, análise de pus e escarro, por exemplo), exames histopatológicos, cultivo em meio de cultura próprio para isolamento do agente e inoculação em animais de experimentação. Quando são atingidos órgãos internos, os testes sorológicos têm especial valor; o mais utilizado é a imunodifusão em gel de ágar. Esses testes revelam a existência do microrganismo antes mesmo dos exames de cultura e histopatológico, e têm amplo uso na confirmação da doença.

O tratamento da moléstia aqui em estudo 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 utilizadas com mais frequência são: itraconazol, cetoconazol, sulfametoxazol, trimetoprim e anfotericina B, que apresentam eficiência significativa, mas severos efeitos colaterais. O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado quanto do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. A regressão das alterações clínicas provocadas pela PCM é observada entre um e seis meses após o início do tratamento. 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 houve a diminuição ou a eliminação dos sintomas, bem como o desaparecimento das lesões ativas (PALMEIRO et al., 2005).

A PCM é adquirida pela inalação de esporos e não é transmitida de pessoa a pessoa, pois à temperatura corporal o fungo está na forma de levedura (RESTREPO-MORENO, 1993; DA SILVA et al., 2000; SOUTO et al., 2000). No hospedeiro, os esporos transformam-se em leveduras e passam a multiplicar-se por brotamento múltiplo. O fungo, em sua forma de levedura, pode ser eliminado por células do sistema imune ou propagar-se para os tecidos, por vias linfáticas e, principalmente, hematogênicas, ocasionando a doença, que pode progredir até a morte. O sítio de infecção primária da PCM (o qual às vezes não é aparente) é o pulmão. Depois de instalado, o *P. brasiliensis* causa uma benigna e transiente infecção pulmonar ou oral em indivíduos normais. A infecção primária é quase sempre subclínica em indivíduos com o sistema imune normal. Se o hospedeiro torna-se imunodepressivo, uma reativação tardia subsequente resulta em infecção crônica dos pulmões ou de outros órgãos, especialmente os tecidos mucoso e cutâneo, os linfonodos, as adrenais e o sistema nervoso central (ALMEIDA, 2005).

A presença de febre é irregular e, em geral, pouco intensa. Seu surgimento pode ser decorrente de coinfeções bacterianas, tais como as provocadas por *Mycobacterium tuberculosis* ou outros microrganismos comuns. No pulmão, o *P. brasiliensis* dá origem a manifestações clínicas de maneira muito insidiosa; por exemplo: tosse seca, posteriormente produtiva, e dispneia, quando há esforço físico. As lesões da mucosa oral resultam de disseminação hematogênica, a partir de um foco primário pulmonar. Na boca, nota-se uma estomatite moriforme, geralmente acompanhada por um conjunto de sinais e sintomas que incluem sialorreia, sangramento, abaulamento dentário e dor. Lesões de palato mole e faringe causam odinofagia, que leva ao emagrecimento e à piora do estado geral do paciente. O acometimento da laringe e das cordas vocais ocasiona diversos graus de disфонia, ou mesmo afonia (TELLES, 2005).

Após atingir os pulmões, o fungo é drenado para os linfonodos regionais, estabelecendo uma lesão linfática satélite. As lesões de inoculação e linfática regional formam o chamado “complexo primário”, que pode: 1) regredir, com a destruição do fungo e a formação de cicatrizes estéreis; 2) retroceder, com a permanência de fungos viáveis no interior das cicatrizes, formando focos quiescentes; 3) progredir, determinando o aparecimento de sinais e sintomas, o que caracteriza a paracoccidioidomicose-doença (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MONTENEGRO; FRANCO, 1994; BRUMMER et al., 1993; SEVERO et al., 1979).

A PCM apresenta-se sob duas formas clínicas diferentes: a infecção e a doença. Quando ocorre a infecção, esta é assintomática e ocorre frequentemente em indivíduos saudáveis que residem (ou residiram) em áreas endêmicas e que possuem reatividade ao teste de pele com paracoccidioidina (RESTREPO; MORENO, 1993). Também são incluídos nessa forma clínica os indivíduos com lesões residuais inativas que contenham *P. brasiliensis*. Já a PCM doença é sintomática e, dependendo de seu curso, divide-se em dois grupos: aguda ou crônica, cujos critérios de classificação encontram-se na tabela 1:

(a) A forma aguda ou subaguda (juvenil) representa cerca de 3 a 5% dos casos e se caracteriza por pequenos períodos de incubação do fungo (semanas a meses). É mais severa, com rápida propagação para órgãos do sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea), além de provocar múltiplas lesões (multifocal). Ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos. Os pacientes em geral apresentam depressão da resposta imune celular e aumento na produção de anticorpos específicos. Os achados histopatológicos demonstram a presença de processo inflamatório inespecífico, com granulomas pouco organizados que contêm numerosos fungos. As manifestações clínicas compreendem adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando doenças linfoproliferativas, com comprometimento sistêmico agudo, febre e anorexia (FRANCO et al., 1987; RESTREPO-MORENO, 1993; BRUMMER et al., 1993).

(b) A forma crônica (adulto) — cerca de 90% dos casos — apresenta um curso lento (meses a anos) e surge com maior frequência em pacientes do sexo masculino com idade superior a 30 anos. Afeta, primeiramente, os pulmões (unifocal), levando a significativa morbidade. Posteriormente, a doença pode disseminar-se para outros órgãos e tecidos (multifocal), o que causa lesões secundárias em membranas, mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (FRANCO et al., 1987; LONDERO; RAMOS, 1990).

Tabela 1. Principais características clínicas, imunológicas e histopatológicas das formas aguda e crônica da paracoccidioidomicose.

	Forma aguda (juvenil)	Forma crônica (adulto)
Idade do paciente	Inferior a 30 anos	Acima de 25 anos
Quadro clínico típico	Adenomegalia cervical ou generalizada	Pneumopatia e/ou ulceração na mucosa bucofaríngea
Alterações e lesões	Hepatomegalia, esplenomegalia, lesão de pele, mucosa bucofaríngea, intestinal, óssea	Adenomegalia, submandibular e/ou cervical, lesão de pele, de laringe, de supra-renais e de sistema nervoso central
Anticorpos anti-<i>P. brasiliensis</i>	Títulos altos	Títulos médios a altos
Imunidade celular e hipersensibilidade retardada	Depressão moderada a intensa	Preservada ou depressão moderada
Histopatologia	Granulomas frouxos Muitas leveduras Evolução para necrose e supuração.	Granulomas compactos Menor número de leveduras Evolução para necrose e fibrose

(Adaptado: MARTINEZ, 2004)

Após atingir os pulmões, o fungo pode espalhar-se via linfo-hematogênica, atingindo, com maior frequência, linfonodos, mucosas, pele, glândula suprarrenais e, ainda, embora com menor repetição, a medula óssea, o baço, o fígado, o sistema nervoso central e outros órgãos (BERBERT et al., 2007; BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MONTENEGRO; FRANCO, 2004). Em qualquer fase, histopatologicamente, a doença segue um padrão comum às micoses profundas e inicia-se com um fluxo de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) em resposta à presença do microrganismo. Da degranulação dessas células, que pode ser disparada por tentativas frustradas de fagocitar o fungo, ou por atividades citotóxicas, forma-se um microabscesso bem delimitado. Em sequência, se os neutrófilos falham em destruir as células fúngicas, fagócitos mononucleares (macrófagos) chegam à área de infecção e envolvem a zona supurativa central, engolfando os microrganismos e restos celulares. Nessa etapa, histiócitos ativados acumulam-se de forma coesa, adquirindo uma morfologia peculiar, caracterizada por “células epiteloideas”. A presença de macrófagos ativados, epiteloideas, em conjunto com a presença de linfócitos que regulam a resposta imune e, ainda, com fibroblastos atraídos para a região de agressão (em seguida, ativados por mediadores específicos), assinala, desse modo, a formação de granulomas (KAMINAGAKURA et al., 2007; BRITO; FRANCO, 1994; MONTENEGRO; FRANCO, 1994). Essa resposta adaptativa celular é usualmente eficaz na contenção da infecção, conforme observado pelo contraste entre a frequência de positividade para

paracoccidioidina e o número de doentes. Em geral, os granulomas são bem formados e densos nos pacientes com formas menos agressivas da doença (KAMINAGAKURA et al., 2007; CALISH; KASHINO, 1998). O macrófago é a principal célula integrante do granuloma e exerce atividades microbidas e de apresentação de antígeno, além de, juntamente com os linfócitos T, produzir citocinas.

A reação granulomatosa na PCM é uma resposta imunológica específica à infecção pelo fungo. Essa resposta é um processo dinâmico, no qual a população de células infiltradas no local varia com o decorrer da infecção (FRANCO, 1994).

O processo inflamatório granulomatoso na PCM é dividido em três fases distintas: **(1) Fase monicítica – neutrofílica:** é considerada a fase inicial da formação do granuloma na PCM experimental, em que há atração e organização concêntrica de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares em relação ao foco inflamatório. A interação desses fagócitos com o fungo induz à secreção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , que estimula a migração e a diferenciação dos monócitos (FIGUEIREDO et al, 1993). **(2) Fase pré-granulomatosa:** aqui ocorre a mobilização de macrófagos para o sítio inflamatório. Os macrófagos sofrem diferenciação para células epiteloideas (núcleo alongado e citoplasma expandido) e fundem seus citoplasmas, formando as células gigantes, que caracterizam um granuloma do tipo epiteloide. **(3) Fase granulomatosa,** em que infiltrados de linfócitos T são detectados ao redor do granuloma, sendo que a maioria desses linfócitos tem fenótipo CD4+ e alguns, CD8+ (FRANCO et al., 1993), de acordo com a figura 3.

A reação granulomatosa que ocorre na PCM humana e experimental representa a resposta mais especializada e eficiente do tecido hospedeiro na tentativa de bloquear e conter o fungo, prevenindo a multiplicação e a disseminação em outros órgãos e tecidos.

A PCM depende da interação entre o fungo e a resposta imune do hospedeiro para evoluir em direção à cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo, causando uma doença granulomatosa crônica. De maneira geral, aspectos da imunidade celular em pacientes com a forma crônica da PCM apontam para uma hiporresponsividade cutânea e para uma queda na relação entre linfócitos T CD4/CD8+ nas lesões. Também se demonstrou que linfócitos T de certos pacientes produzem níveis baixos de IL-2, IL-12 e IFN- γ , associados à produção aumentada de IL-4 e IL-10 (BERNARD; FRANCO, 2001).

Figura 3. Formação de granuloma maduro. Após dias da exposição ao antígeno, células Th1 CD4+ são recrutadas ao sítio de infecção, devido à liberação de TNF- α e quimiocinas produzidas pelas células residentes. A interação entre essas células T e macrófagos ativados leva a produção de IFN- γ e TNF- α , que resulta na maturação de macrófagos. O granuloma é formado após dias ou semanas desse evento. Outras células, como neutrófilos e células B também são encontradas no granuloma (Adaptado de: SARRAF & SNELLER, 2005).

Na PCM, as imunidades inata e específica são mecanismos utilizados pelo hospedeiro no combate ao *P. brasiliensis* — e a imunidade celular é a principal defesa contra o fungo (CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2000; DINIZ et al., 2004; BOZZI et al., 2004; BOZZI et al., 2006). Na imunidade inata, os fagócitos têm importante papel na defesa dos hospedeiros, uma vez que *P. brasiliensis* é um microrganismo intracelular facultativo (RESTREPO-MORENO, 1993; CALVI et al., 2003). De acordo com vários estudos, esse fungo é fagocitado por macrófagos que apresentam efeitos fungicidas para o *P. brasiliensis* e, portanto, são necessários para a eliminação do mencionado agente etiológico (POPI et al., 2002). Em células humanas, macrófagos tratados com IFN- γ recombinante ou com citocinas de sobrenadante de células mononucleares estimuladas com concanavalina A restringiram a replicação do fungo, mas perderam a atividade fungicida (CALVI et al., 2003). Para uma eliminação efetiva do *P. brasiliensis* por monócitos, é necessário um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN- γ , a fim de estimular as células a produzirem TNF- α , que poderá estar envolvido, por intermédio de uma via autócrina, na fase final do processo de ativação (CALVI et al., 2003). Além disso, o IFN- γ incita os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o qual inibe a transformação de *P. brasiliensis* de conídio em levedura (GONZALEZ et al., 2000).

Muitas pessoas são expostas ao fungo em questão, mas apenas um pequeno número desenvolve os sintomas clínicos, indicando que ambos os sistemas (inato e

adaptativo) são importantes no controle do *P. brasiliensis* (MUSATTI et al., 1994). A imunidade mediada por células é geralmente mais significativa que a imunidade humoral, e macrófagos são importantes na defesa. Essa importância já foi retratada em sistemas murinos, pois a ingestão de leveduras do fungo permite que estas últimas multipliquem-se no interior de macrófagos peritoneais e alveolares (BRUMMER et al., 1989). Além disso, a imunidade mediada por células é um fator mais significativo do que a imunidade humoral, e a ativação de macrófagos parece promover a mais importante linha de defesa. Considerando a patogênese da paracoccidioidomicose, os estágios iniciais dessa doença são de extrema importância, principalmente quando macrófagos residentes no pulmão interagem com o fungo pela primeira vez e tornam-se ativados (SOARES et al., 2010).

Durante a PCM ativa, baixos níveis de IFN- γ , mas altos níveis de IL-10, influenciam na resposta ao antígeno e na indução de uma resposta mediada por células. Um defeito na resposta de macrófagos no início da infecção pode resultar no bloqueio da atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*. Estudos experimentais em pacientes com PCM indicaram que a resistência do fungo depende da atividade de células T *helper* e de macrófagos/monócitos, mediados por IFN- γ e TNF- α . O efeito sinérgico entre essas duas citocinas é essencial para a defesa do hospedeiro e para a atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* (CALVI et al., 2003; FORTES et al., 2011).

TNF- α atua nas funções dos macrófagos, tanto na PCM humana quanto na experimental, modulando e amplificando a resposta imune, ao provocar uma reação granulomatosa e uma atividade fungicida mediada pelos macrófagos. A ausência dessa citocina resulta na perda de mecanismos de defesa associados à incapacidade de desenvolver uma reação granulomatosa, que é efetiva para conter a multiplicação do fungo (SOUTO et al., 2000; FORTES et al., 2011). A falta de ativação de macrófagos por IFN- γ na PCM crônica pode produzir monócitos/macrófagos incapazes de controlar a infecção. Dessa forma, destruir o fungo *in vivo* dependerá do balanço de fatores inibitórios e estimulatórios nas células efectoras (CALVI et al., 2003). O equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias produzidas por macrófagos, durante o processo infeccioso, pode determinar a progressão da doença ou a morte do fungo (SIQUEIRA et al., 2009).

A resposta inflamatória contra fungos serve para limitar a infecção, mas também contribui para a patogenicidade, como já foi observado em pacientes com severas infecções fúngicas. As funções antifúngicas efectoras dos fagócitos incluem destruição e inibição do crescimento do fungo. Esses fagócitos apresentam atividade intrínseca contra os fungos, e essa atividade pode ser aumentada por opsoninas e

citocinas derivadas de células T. Isso indica que os sistemas imunes inato e adaptativo trabalham de maneira dependente e são regulados de maneira recíproca (ROMANI, 2004).

Na maioria das micoses, monócitos/macrófagos são decisivos em funções imunes efetivas, além de estarem implicados em mecanismos inatos contra infecções fúngicas (LOUIE, et al., 1994; SMITH et al., 1990). Essas células têm um papel importante na regulação da produção de citocinas: funcionam como mediadores de resposta inflamatória. Conforme observado em outras micoses sistêmicas, a defesa mais relevante do hospedeiro contra a PCM é a imunidade celular mediada principalmente por IFN- γ , durante a ativação de macrófagos (KASHINO et al., 2000).

Os macrófagos são componentes de um sistema de fagócitos mononucleares pertencentes a uma família de células que têm uma linhagem comum, isto é, que se originam na medula óssea e circulam no sangue como monócitos. 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). São células versáteis, capazes de responder a diferentes estímulos do ambiente e possuem um fenótipo heterogêneo, como resultado da diferenciação celular e da resposta a diversos estímulos endógenos e exógenos. Por conseguinte, possuem papel importante na percepção de patógenos, na secreção de citocinas e mediadores inflamatórios, além de apresentarem antígenos para as células T (GORDON, 2003; FOLDI et al., 2010).

São consideradas células indispensáveis ao sistema imune e exercem funções críticas, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. No sistema imune inato, macrófagos residentes promovem defesa imediata contra patógenos e coordenam a infiltração leucocitária. Também participam do processo de fagocitose e degradação de células apoptóticas, microrganismos e células neoplásicas (GORDON, 2003). A ativação de macrófagos pode ser pró-inflamatória ou anti-inflamatória, contribuindo para a destruição do tecido ou para sua regeneração. São igualmente importantes no direcionamento da resposta imune adaptativa, influenciando no fenótipo das células T, que variam de acordo com os sinais emitidos (MANTOVANI et al., 2005).

Durante o processo inflamatório, os macrófagos exercem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação, por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos inflamatórios diferem dos macrófagos residentes especialmente pela maior capacidade fagocítica e pela habilidade aumentada de gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio

(FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). As citocinas e os produtos microbianos afetam de modo diferente a função dessas células, ativando ou desativando-as (MANTOVANI et al., 2004).

A fagocitose promovida pelos macrófagos na resolução da inflamação é enfatizada por condições patológicas, que podem manifestar-se como infecções persistentes ou lesões inflamatórias crônicas. Durante a diferenciação a partir dos monócitos, macrófagos adquirem receptores especializados e a maquinaria necessária para o reconhecimento de patógenos (SCULL et al., 2010).

Além disso, macrófagos teciduais existem em maior número do que as células dendríticas e podem, 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 terminante na imunidade inata, fagocitando partículas estranhas e produzindo citocinas. Atuam também como importantes células acessórias e efetoras na imunidade adquirida, apresentando antígenos aos linfócitos T (METZER, 2000; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

As citocinas produzidas pelos macrófagos dependem do tipo de polarização que essas células adquirem (M1/M2), o que define as funções distintas das populações de macrófagos, em resposta a fatores que dominam o cenário inflamatório (MARTINEZ et al., 2008). Essa polarização de macrófagos foi observada por Gordon e seus colegas, que submeteram macrófagos a IL-4 ou a IL-13 e constataram uma “ativação alternativa”, com fenótipos distintos, à ativação clássica de macrófagos (GORDON, 2003).

Macrófagos ativados pela via clássica, chamados M1, em geral produzem níveis elevados de IL-12 e baixos níveis de IL-10, atuando como indutores e efetores de resposta imune Th1. Essas células apresentam ainda atividades citotóxicas, resultado de sua capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido) e pró-inflamatórias, com liberação de citocinas TNF, IL-1 e IL-6 (MANTOVANI et al., 2004). Tais células têm sido denominadas de macrófagos M1, por serem provenientes de linhagens de camundongos Th1 (C57BL/6 e B10/A), a exemplo da nomenclatura dos linfócitos Th1 (MILLS et al., 2000; MANTOVANI et al., 2002; BASTOS et al., 2002; MOSSER, 2003).

Mediadores distintos foram reportados como inibidores do desenvolvimento de células M1 e atribuíram-se propriedades anti-inflamatórias aos macrófagos, os quais são coletivamente designados M2, procedentes de uma ativação “alternativa”. Células M2 referem-se a várias formas de ativação de macrófagos, e aí se incluem aquelas que se expuseram a IL-4 e IL-13, e também a complexos imunes, IL-10 ou glicocorticoides (GORDON, 2003). Geralmente, células M2 produzem níveis reduzidos de citocinas inflamatórias, secretam moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e induzem resposta imune Th2 (MANTOVANI et al., 2004). Essas células têm sido denominadas macrófagos M2, por terem origem em linhagens de camundongos Th2 (BALB/c e DBA/2).

A presença de macrófagos com fenótipo M2 em indivíduos saudáveis (na placenta, nos pulmões e em sítios imunes), bem como em doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatoide e aterosclerose, por exemplo), sugere que essas células exercem proteção contra danos da resposta imune, devido à elevada produção de elementos envolvidos na remodelação tecidual e no aumento da atividade de fibroblastos (SONG et al., 2000) e promoção de angiogênese (KODELJA et al., 1997).

A interação entre as moléculas de superfície do fungo e os receptores presentes na membrana celular das células fagocíticas, como macrófagos, modula a fagocitose e a ativação dessas células. Esses receptores são conhecidos como PRRs e são capazes de reconhecer os PAMPs. A família dos receptores do tipo Toll é a classe de PRRs mais bem caracterizada em espécies de mamíferos. Tais receptores são peça fundamental na resposta inata e na consequente ativação da resposta adaptativa (HERTZOG, 2008). Após o reconhecimento dos PAMPs, TLR inicia a cascata de sinalização por meio da molécula adaptadora MyD88 e/ou TRIF. Essa molécula é recrutada e mostra-se capaz de ligar-se ao domínio TIR do TLR, permitindo o recrutamento e a ativação das *kinases* (IRAKs). O resultado é a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1, IRF3 e IRF7, bem como (e consequentemente) a produção de citocinas pró-inflamatórias e INF- γ (O'NEILL; BOWIE, 2007; LIEW et al., 2005). Da regulação apropriada decorre a resolução do foco primário de inflamação, ao passo que resposta inapropriada leva a sepse, inflamação crônica, doenças autoimunes e câncer (LIEW et al., 2005; HERTZOG, 2008). Dessa forma, a regulação da sinalização via TLR é extremamente importante para o controle da resposta inflamatória, pois pode promover a ativação de genes envolvidos em citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α , IL-6, IFN do tipo I (α e β) e do tipo II (γ), e citocinas imunorreguladoras, como IL-12 e IL-10.

A família dos receptores do tipo Toll (TLR) é a classe de PRRs mais bem caracterizada em espécies de mamíferos. Esses receptores conseguem detectar múltiplos PAMPs, inclusive lipopolissacarídeo - LPS (detectado por TLR4), lipoproteína bacteriana e ácido lipoteicoico (detectados por TLR2), flagelina (detectada por TLR5) e DNA de bactérias e vírus (detectado por TLR9). A ativação de macrófagos via TLR permite a produção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6 e IL-12, por exemplo), regulando também a diferenciação celular.

A ativação de TLRs em células apresentadoras de antígenos permite a expressão de IL-12 e a subsequente ativação de células Th1 produtoras de IFN- γ . Curiosamente, a falta de produção de IL-12 mediante a ativação limitada de TLR, durante a resposta inflamatória/imune, induz a uma resposta do tipo Th2, sugerindo que esse tipo de resposta é um “defeito” da sinalização ocorrido na ausência de IL-12.

Além dos TLRs, recentemente tem sido demonstrada a importância dos receptores Notch na regulação da atividade de macrófagos e do sistema imune.

A sinalização Notch é evolutivamente conservada e apta a controlar diversos aspectos do desenvolvimento e da homeostase dos tecidos. No sistema imune, Notch participa da linfopoiese, da geração de células hematopoéticas e de células B. O gene Notch foi descoberto por Morgan e colaboradores, ao observarem que a perda parcial da função resulta em indentações nas regiões marginais das asas de *Drosophila melanogaster* (MORGAN, 1917). Em mamíferos, há 4 receptores Notch (Notch 1-4) e 5 ligantes (Jagges 1 – 2, Delta 1, 3 e 4). Originalmente, Notch foi classificado como gene neurogênico, porém seus sinais podem afetar diversos tecidos (BORGREFFE; OSWALD, 2009).

A comunicação celular mediada pelo receptor Notch é essencial para a geração correta e para o direcionamento das células e dos tecidos. A caracterização inicial de Notch em *Drosophila* por Donald Poulson permitiu verificar que a ausência da atividade desse gene em embriões causou hiperplasia no tecido neuronal — um fenômeno conhecido como “neurogênico”; depois, verificou-se que se tratava de uma característica dos mutantes de *Drosophila*. Esse achado permitiu classificar a cascata de sinalização Notch com uma definição genética, em que Notch interage com genes neurogênicos importantes na formação do sistema nervoso. Entretanto, Poulson notou que os mutantes do gene Notch também apresentavam outros defeitos na formação do embrião e dos tecidos, indicando que essa via de sinalização não estava apenas envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso, mas também na maioria das decisões celulares relevantes no desenvolvimento do animal. Hoje, sabe-se que o

gene em questão participa de diversos sistemas e de várias decisões celulares, não apenas com relação à *Drosophila*, mas também a outros reinos biológicos (FIOR; HENRIQUE, 2009).

Figura 4. Processos Moleculares envolvidos na sinalização Notch. (I) Repressão dos genes alvos de Notch. Na ausência da sinalização Notch, o RBP-J recruta um complexo de co-repressores capaz de reprimir a transcrição dos genes alvos de Notch. (II) Ativação dos genes alvos de Notch. O NICD interage com o RBP-J recrutando um complexo de co-ativadores, promovendo a transcrição dos genes alvos da via (Adaptado de: BORGREFFE & OSWALD, 2009).

A ativação da sinalização Notch ocorre mediante o contato célula-célula, como resultado da interação entre o receptor Notch e seus ligantes (Delta ou Jagged). Em uma análise feita em nível molecular, essa interação induz a duas clivagens proteolíticas sucessivas. A primeira acontece no domínio extracelular, mediada pela metaloprotease da família ADAM; a segunda ocorre no domínio da membrana e é mediada pela γ -secretase. Essa segunda clivagem permite a liberação e a translocação do NICD em direção ao núcleo, atuando como coativador transcricional. O NICD não consegue ligar-se diretamente ao DNA, mas é capaz de se ligar à proteína RBP-J ou ao CSL e, então, ativar a transcrição dos genes alvos dessa via. Quando o NICD se conecta ao CSL, juntamente com o coativador *Mastermind* e acetiltransferases de histonas, forma-se um complexo transcricionalmente ativo (KOVALL, 2008). Esse complexo é capaz de ativar a expressão de genes da família *Hes* e *Hey*, que funcionam como inibidores da sinalização Notch. Além dos membros da família *Hes* e *Hey*, existem vários genes implicados diretamente em diversas

neoplasias, os quais são sobre-expressos, como consequência direta da sinalização Notch dependente de CSL (FISCHER; GESSLER, 2007). Entretanto, na ausência de Notch, o RBP-J ou o CSL recrutam um complexo correpressor capaz de reprimir a transcrição dos genes alvos de Notch. Essa sinalização não utiliza mensageiros secundários, e a atividade é dependente da concentração nuclear do NICD.

Contudo, o complexo ativador de Notch tem um tempo de vida curto, o que torna extremamente difícil detectar a presença de NICD no núcleo celular. Por essa razão, para detectar a ocorrência de sinalização Notch, é necessário recorrer a métodos de detecção indiretos, como a evidência de clivagens dos receptores e o estudo da expressão dos genes-alvo. Até a presente data, os genes-alvo mais conhecidos da sinalização canônica de Notch, mediada por RBP-J, são os fatores de transcrição *Hey1*, *Hey2*, *Hes1*, *Hes5*. Já há, porém, evidências de estarem relacionados à hematopoiese (FISCHER; GESSLER, 2007).

O receptor Notch e os ligantes são alvos de proteólise, glicosilação, ubiquitinação e outras modificações, como a fosforilação. Esses fenômenos alteram a sensibilidade da interação dos ligantes com o receptor Notch, permitem o tráfego do receptor e seus ligantes em compartimentos endocíticos e estão implicados na degradação e na reciclagem de Notch. Na superfície da célula, tanto os ligantes quanto o receptor Notch são constantemente internalizados. Esse tipo de endocitose parece ser mediado pela ubiquitinação de proteínas transmembranares na membrana plasmática, por uma ligase de ubiquitina E3. Após a endocitose, os ligantes podem ser novamente reciclados para a membrana, tornando a ativação Notch mais eficiente. No entanto, um evento posterior de ubiquitinação dessas proteínas nos endossomas pode marcar tanto os ligantes quanto o receptor Notch, para a degradação em lisossomas (WU; BRESNICK, 2007).

A comunicação entre células mediada por Notch parece operar de duas maneiras: por inibição lateral e por indução lateral. A via de sinalização Notch permite que uma célula expressora do ligante Delta ou Jagged altere o programa genético da célula vizinha que expressa o receptor Notch, podendo funcionar de um modo indutivo ou inibitório. Quando a via funciona de modo inibitório, a produção do ligante é reduzida e a do receptor, aumentada na célula que recebe o estímulo e é, assim, inibida de adotar o mesmo destino das células vizinhas (KIMBLE; SIMPSON, 1997). A inibição lateral é o mecanismo de ação de Notch mais conhecido e o que parece ocorrer na maior parte dos contextos celulares. Esse mecanismo pode ser observado em neurônios recém-diferenciados, que inibem progenitores neurais vizinhos de seguir um caminho idêntico, mantendo, assim, uma reserva de células indiferenciadas.

Entretanto, quando a via funciona de modo indutivo, a célula que recebe o estímulo Notch vai produzir mais quantidade de ligantes e receptores; assim, é induzida a adquirir o mesmo destino das células vizinhas (KIMBLE; SIMPSON, 1997), conforme se observa na figura 5.

Figura 5. Funções de Notch no desenvolvimento e diferenciação. (A) Dentro de um grupo de células do mesmo tipo que expressam quantidades iguais dos ligantes e receptores de Notch, uma única célula começa a diferenciar-se em uma célula precursora neuronal, ativando a via de Notch nas células vizinhas promovendo a inibição da diferenciação neuronal. (B) A célula precursora é instruída a adotar o destino A na ausência do ligante. Na presença do ligante, a via de Notch é ativada e instrui a célula precursora a adotar o destino B (Adaptado de: BORGREFFE & OSWALD, 2009).

. Estudos vêm demonstrando que a sinalização Notch participa do desenvolvimento de linfócitos, bem como de sua maturação, ativação e transformação (WENG; ASTER, 2004; MAILLARD et al., 2003; WENG et al., 2004). No entanto, a sinalização Notch pode também influenciar a diferenciação das células mieloides (CARLESSO et al., 1999; DELANEY et al., 2005), e o papel dessa via permanece indeterminado em macrófagos e em muitas outras doenças (AIKAWA; LIBBY, 2004).

A sinalização Notch pode ser ativada em macrófagos *in vivo*, por meio de ligantes de Notch, que são expressos de maneira constitutiva ou indutiva em macrófagos. O processo em questão também pode ocorrer por intermédio de ligantes de Notch expressos em outras células, como as epiteliais do sítio inflamatório (HU et al., 2008). Os ligantes de Notch estão envolvidos nos sítios inflamatórios da infecção, pois ocorre aumento de sua expressão na superfície de células compreendidas nesse processo (YABE et al., 2005; NIRAJAN et al., 2008).

No sistema imune, a sinalização Notch rege múltiplas etapas de desenvolvimento de células T e B, além de regular as funções e a diferenciação das células T. Os ligantes e receptores de Notch são induzidos em macrófagos por vários estímulos (entre os quais, a ativação de TLR), e alguns trabalhos vêm demonstrando o papel importante do processo em estudo na apresentação de antígenos por meio do ligante Delta 1, que promove células do tipo Th1, ou pelo ligante Jagged, o qual origina

células do tipo Th2. A sinalização Notch também vem sendo associada ao desenvolvimento de células mieloides, como macrófagos; e TLR parece ativar indiretamente a via de Notch, estimulando a ativação de NF- κ B e TNF- α (FUNG et al., 2007; MONSALVE et al., 2006; PALAGA et al., 2008; HU et al., 2008).

Já se demonstrou que macrófagos de linhagem estimulados com LPS+IFN- γ apresentam um aumento da expressão de receptor Notch-1, assim como do ligante Jagged-1 (MONSALVE et al., 2006). Na esteira dessa constatação, Fung e colaboradores (2007) mostraram que macrófagos humanos estimulados com LPS apresentam aumento na expressão do ligante Delta-4, a qual é dependente da ativação de TLR4 e NF- κ B. Segundo esses mesmos autores, a ativação da via Notch por Delta-4 levou à transcrição de genes pró-inflamatórios, como o IL1- β em macrófagos (FUNG et al., 2007).

De acordo com um trabalho recentemente publicado, a ativação da via de sinalização Notch aumenta a expressão de NF- κ B e favorece a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, como as citocinas TNF- α e IL-6 ou enzimas (a iNOS, por exemplo) (MONSALVE et al., 2009). Os citados autores demonstraram que o ligante Delta-4 parece ser o mais eficaz para induzir a ativação de NF- κ B nesses macrófagos.

Segundo Monsalve e colaboradores (2006), Notch interfere na atividade de fatores transcricionais implicados na ativação de macrófagos, como AP-1 e STAT 1/3, mas sem afetar fatores importantes, como NF- κ B. Dessa forma, a sinalização Notch pode estar envolvida na modulação da função de macrófagos em uma resposta imunológica. Por exemplo, os macrófagos em um foco infeccioso podem não encontrar o ligante apropriado para ativar Notch — uma situação que favorece sua atividade citotóxica. Em contrapartida, os macrófagos que migraram para os órgãos linfoides, a fim de ativar as células T, poderão receber uma ativação adequada de Notch, potencializando sua capacidade de apresentar o antígeno e limitando os seus efeitos citotóxicos. Os ligantes de Notch estão vinculados aos sítios inflamatórios da infecção, pois ocorre aumento da expressão desses ligantes na superfície de células envolvidas nesse processo (YABE et al., 2005; NIRAJAN et al., 2008).

Palaga e colaboradores (2008) demonstraram o envolvimento da sinalização Notch na regulação da resposta inflamatória em macrófagos, após estimulação com LPS. Em 2011, Palaga e Wongchana salientaram que Notch regula diretamente IL-6, ao associar-se com o CSL, o qual se liga à região promotora do gene de IL-6. Sabe-se

que a sinalização Notch depende do contexto do ambiente e que o controle da produção de IL-6 pode ser regulado de maneira diferente, conforme os tipos celulares.

Recentes evidências sugerem a existência de uma interação entre as sinalizações Notch e TLR (FOLDI et al., 2010; PALAGA et al., 2008). A ativação de TLR é capaz de regular a expressão dos ligantes de Notch e o RBP-J, favorecendo a sinalização Notch. De acordo com Hu e colaboradores (2008), existe cooperação entre TLR e Notch, o que modula a ativação dos genes-alvo de Notch. Este, por sua vez, condiciona negativamente um subconjunto de genes de TLR, elaborando a resposta imune inata e adaptativa, ao demonstrarem que TLR regula diretamente a expressão canônica dos genes alvos de Notch, *hes 1* e *hey 1*, em macrófagos derivados de sangue humano, sem a necessidade de indução do NICD (Domínio Intracelular de Notch) ou dos ligantes de Notch, conforme ilustra a figura 1. Dessa forma, a sinalização Notch pode estar implicada na modulação da função de macrófagos em uma resposta imunológica.

Considerando a importância dos macrófagos na defesa imunológica do hospedeiro, resta-nos descobrir como os componentes de sinalização de Notch presentes nessas células influenciam em sua ativação. Certamente, a compreensão dessas questões será importante para o melhor conhecimento das respostas imunes inata e adaptativa na PCM experimental.

Objetivos

---

2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho são:

- ✓ Avaliar o papel do *P. brasiliensis* na expressão de ligantes e receptores envolvidos na via de sinalização Notch em macrófagos da linhagem J774;
- ✓ Avaliar a influência exercida pelo DAPT (inibidor da via Notch) na produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos da linhagem J774 após interação com *P. brasiliensis*.

Material e Métodos

---

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fungo

Utilizou-se a cepa virulenta Pb 18 (KASHINO et al., 1987) do *P. brasiliensis* nos ensaios de interação com macrófagos da linhagem J774. A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-água (Merck – Darmstad, Alemanha), em estufa a 37°C, com repiques semanais.

3.2. Cultura de macrófagos da linhagem J774

Os macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife – SP, Brasil), L-glutamina (2mM) e gentamicina (40µg/mL). A cultura foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂, com repiques semanais.

3.3. Preparação do inóculo de *P. brasiliensis*

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

3.4. Interação de macrófagos J774 com *P. brasiliensis* para análise por RT-PCR

Após cultivo, cerca de 2×10^6 J774/poço foram incubados em placa de 6 poços (Costar Corning – NY, USA) utilizando-se meio RPMI-1640 (Sigma – St.Louis, MO, USA), com 10% de soro fetal bovino por 40 minutos. Decorrido esse tempo, adicionou-se o DAPT -10µM/mL (Tocris Biosciences – Ellisville, MO, USA) ou LPS -1mg/mL (Sigma – St.Louis, MO, USA) e incubou-se em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h e 16-18h, respectivamente. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x para posterior interação com 2×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*/poço, por 24h.

3.5. Interação de macrófagos J774 com *P. brasiliensis* para ELISA e Ensaio de Fagocitose

Após cultivo, cerca de 1×10^5 J774/poço foram incubados por 40 minutos em placa de 24 poços (TPP – Suíça) contendo lamínulas circulares de 13mm de diâmetro, utilizando-se meio RPMI-1640 (Sigma) com 10% de soro fetal bovino. Decorrido esse tempo, adicionou-se o DAPT - $10 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Tocris Bioscience) ou LPS - $1 \text{mg}/\text{mL}$ (Sigma – St.Louis, MO, USA) e incubou-se em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24h e 16-18h, respectivamente. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x para posterior interação com 1×10^5 leveduras de *P. brasiliensis*/poço por 4, 12 e 24h.

3.6. Interação de macrófagos J774 com *P. brasiliensis* para análise por Citometria de fluxo

Após cultivo, cerca de 2×10^6 J774/poço foram incubados por 40 minutos em placa de 6 poços (Costar Corning – NY, USA), utilizando-se meio RPMI-1640 (Sigma – St.Louis, MO, USA), com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife – SP, Brasil). Após incubação, adicionou-se 2×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*/poço e realizou-se a interação por 4 e 8h.

3.7. Inibição da via de Notch

Para os ensaios nos quais a via de Notch foi inibida, macrófagos J774 foram pré-incubados por 24h com DAPT, inibidor de γ -secretase (Tocris Biosciences – Ellisville, MO, USA), numa concentração de $10 \mu\text{M}/\text{mL}$. Decorrido o período de incubação com o inibidor, as células foram lavadas com PBS 1x e então interagidas com leveduras do *P. brasiliensis* por 4, 12 e 24h (ensaio de fagocitose e ELISA) ou simplesmente por 24h (ensaio de qRT-PCR).

Após o cultivo de macrófagos J774 e do fungo, o delineamento experimental foi realizado conforme a figura 6, iniciando-se com a interação entre células e leveduras:

Figura 6. Fluxograma de metodologia aplicado nos experimentos.

3.8. RT – PCR: Análise da expressão de RNAm de Notch 1 e Delta 4 em macrófagos J774 após interação com *P. brasiliensis*

3.8.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total das amostras de macrófagos da linhagem J774 e das amostras de macrófagos interagidos com *P. brasiliensis* foi realizada com o Trizol Reagent (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), segundo protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em 1,0 mL de Trizol (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) (1,0 mL de Trizol para 2×10^6 células) e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio (Synth – SP, Brasil) por 1mL de Trizol (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) e agitou-se com as mãos por 15 segundos. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 15000g por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo. O RNA foi precipitado com 500µL de álcool isopropílico (Sigma – St. Louis, MO, EUA) e congelado a -80°C durante uma noite. As amostras foram então centrifugadas a 15000g e 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 75% (1mL EtOH para 1mL Trizol). As amostras foram vortexadas e centrifugadas a 15000g por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi seco por 10-15 minutos no fluxo laminar. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em água DEPC (Fermentas – Lituânia) e incubadas por 10 minutos a 55-60°C. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose (Amersham Biosciences – Suécia).

3.8.2 Quantificação do RNA total

Uma alíquota de cada preparação de RNA extraído foi quantificada pelo método espectrofotométrico a 260nm e a pureza avaliada em um comprimento de onda de 280/260nm (Nanodrop Spectrophotometer Uniscience).

3.8.3 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 (Amersham Biosciences – Suécia), MOPS 10x, formaldeído e água miliQ. O tampão de corrida utilizado foi o MOPS 10x. Nas amostras de RNA, adicionou-se tampão de RNA (3 partes de tampão para 1 parte de RNA), material que foi submetido a aquecimento de 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 100V.

3.8.4 Tratamento de RNA com DNase

Para remover possível DNA genômico das preparações de RNA, o material foi incubado com 10x reaction buffer com $MgCl_2$, DNase I (Fermentas - Lituânia) e água DEPC (Fermentas - Lituânia) a 37°C por 1h. Posteriormente, adicionou-se EDTA (1µL para cada 10 µL do total da reação) e incubou-se a 65°C por 10 minutos.

3.8.5 Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNase foi convertido em cDNA por transcrição reversa, sendo cada reação preparada em um volume final de 20µL. Inicialmente, 1 µg de RNA foi incubado com oligo dT 50mM e dNTPmix 10mM a 65°C por 5 minutos, e em seguida, mantido no gelo por mais 1 minuto. Decorrido esse tempo, adicionou-se às amostras uma mistura contendo 25mM $MgCl_2$, 0,1M DTT, 40U/µL RNase OUT e 200U/µL de Superscript III RT (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) 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°C, seguida de 5 minutos a 85°C. Em seguida, as amostras foram colocadas no gelo, nas quais se adicionou RNase H e realizou-se incubação por 20 minutos a 37°C.

3.8.6. PCR em Tempo Real

As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em volume final de 25µL, contendo cDNA, 5 pmol de cada primer e 10µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) ROX Solution Provided (Fermentas - Lituânia). Os primers utilizados no RT-PCR para **notch 1** foram: 5'GCTGGACTGGCGTCAACT 3' e 5'CACAGAGCCCTCCATGCT 3'; para **delta 4** foram: 5'CACAGGCACCCACTGTGA 3' e 5' CACACAGGCCCATCTCTCC 3'. Utilizou-se o Sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems 7500 para detectar e quantificar a 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°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C, para ativação da enzima Taq DNA polimerase. Houve 40 ciclos de incubação a 95°C por 15 segundos, a 60°C por 1 minuto e a 72°C por 30 segundos. Cada amostra foi testada em triplicata 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).

3.9. Ensaio de Fagocitose

Após cultivo, cerca de 1×10^5 J774/poço foram incubados por 40 minutos em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13mm de diâmetro, utilizando-se meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino. Decorrido esse tempo, adicionou-se o DAPT -10 μ M/mL (Tocris Biosciences – Ellisville, MO, USA) ou LPS -1mg/mL (Sigma – St.Louis, MO, USA) e incubou-se em estufa a 37°C e 5%CO₂ por 24h e 16-18h, respectivamente. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x, para posterior interação com 1×10^5 leveduras de *P. brasiliensis*/poço em uma cinética de 4, 12 e 24h, em estufa de 5%CO₂ a 37°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior análise de citocinas. As lamínulas foram coradas com o kit hematológico comercial Instant-Prov (Newprov – Paraná, Brasil), seguida de fixação em lâminas utilizando-se o Entellan (MERCK – Darmstadt – Alemanha).

As lâminas foram então analisadas através de microscopia ótica e o índice de fagocitose foi determinado pela equação descrita por Campos et.al. (2006), que definiu o índice como o produto entre a percentagem de macrófagos que fagocitaram pelo menos uma levedura e o número médio de leveduras nessas células.

3.10. Dosagem de citocinas (ELISA)

Em uma placa de 96 poços (Costar Corning, NY, USA) adicionou-se o anticorpo anti-citocina de interesse como anticorpo de captura, numa concentração recomendada pelo fabricante, diluído em solução salina tamponada com fosfato – PBS (50 μ L/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 (Vetec Química Fina – RJ, Brasil) (PBS-T), e incubada por 1h à temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio constituída por 1% BSA (Sigma – St. Louis, MO, USA) em PBS 1x. Aos poços, foi adicionada, em duplicata, a citocina recombinante de interesse para obtenção de curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante, e também as amostras do sobrenadante de cultura de macrófagos interagidos com o fungo, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 2h. Então, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e o anticorpo de detecção foi adicionado; a placa foi deixada à temperatura ambiente por 2h. Decorrido esse tempo, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e adicionou-se avidina conjugada à peroxidase, incubada 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 – San Diego, CA, USA). A reação foi bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas

3.11. Marcação das células com anticorpos monoclonais contra Notch 1 e Delta 4.

Após a interação entre células e leveduras do fungo por 4 e 8h, os poços foram lavados com PBS 1x gelado e a placa foi incubada por 5 minutos no gelo. Através da raspagem com auxílio de cell scraper (TPP - Suíça), as células foram soltas e então transferidas para tubo facs (cada poço foi transferido para 3 tubos facs). Os tubos foram centrifugados e o pellet foi ressuspensionado em 100µL de tampão de fixação (eBioscience – San Diego, CA, USA) e incubado por 15 minutos no escuro a 4°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização 1x (eBioscience – San Diego, CA, USA) e ressuspensionadas em 100µL nesse mesmo tampão. Em seguida, as células foram incubadas por 60 minutos com anticorpo anti-Notch-1 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anticorpo anti-Delta-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), a 4°C, numa concentração de 1:100. Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização 1x (eBioscience – San Diego, CA, USA) e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse IgG (feito em goat) conjugado a FITC (Sigma – St. Louis, MO, USA) por 20 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização 1x (eBioscience – San Diego, CA, USA) e ressuspensionadas em 300µL de tampão de fixação (eBioscience – San Diego, CA, USA) ou paraformaldeído 4%. A caracterização das amostras foi adquirida em citômetro de fluxo FacsCanto (Becton & Dickison, CA), e os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo.

3.12. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada através da marcação destas células com PI (Iodeto de propídeo) nos períodos de 4 e 8h na ausência ou presença do fungo. Após a aquisição de dados, estes foram analisados utilizando o programa FlowJo.

3.13. Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados obtidos foi obtida pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey (ZAR, 1984). O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$ em todas as amostras analisadas.

Resultados

---

4. RESULTADOS

4.1 Análise da expressão do receptor Notch 1 em macrófagos após interação com leveduras de *P. brasiliensis*

Com o intuito de estudar a capacidade do *P. brasiliensis* em modular a ativação do receptor Notch 1, macrófagos da linhagem J774 foram incubados na presença ou ausência de leveduras do fungo por 4 e 8h, seguido de análise por citometria de fluxo. Na análise citométrica, verificando-se a intensidade de fluorescência do anticorpo, percebe-se que após interação do fungo há diminuição da fluorescência, o que indica diminuição da expressão desse receptor na superfície dos macrófagos, como visto na figura 7. Conforme demonstrado na figura 8, ao realizarmos sobreposição dos histogramas de ambos os grupos, é possível visualizar com mais clareza a diferença de fluorescência entre o grupo infectado e o grupo não infectado. Esses dados, então, foram calculados a partir da média geométrica da intensidade de fluorescência obtida, com os quais é possível evidenciar a diminuição da expressão do receptor Notch 1 na superfície de macrófagos após interação de 4 e 8h com leveduras do *P. brasiliensis* (Figura 9).

Figura 7. Análise citométrica do receptor Notch 1 na superfície de macrófagos após interação com *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8h. Após esse período, as células foram marcadas com anti-Notch 1 e reveladas com anticorpo secundário conjugado a FITC e, por fim, analisadas no FACS Canto II. (a), (b) e (c) representam a análise realizada após 4h de interação entre os macrófagos e o fungo. (d), (e) e (f) representam a análise realizada após 8h de interação entre os macrófagos e o fungo. Como controle, usou-se células sem marcação. Resultado representativo de dois experimentos.

Figura 8. Detecção citométrica do receptor Notch 1 em macrófagos após interação com *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8h. Após esse período, as células foram marcadas com anti-Notch 1, reveladas com anticorpo secundário conjugado a FITC e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Como controle, utilizou-se células sem marcação. Resultado representativo de dois experimentos.

Figura 9. Expressão de Notch 1 na superfície de macrófagos após interação com leveduras de *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8 h. Após esse período, as células foram marcadas com anti-Notch 1, reveladas com anticorpo secundário conjugado a FITC e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Resultado representativo de dois experimentos.

4.2 Análise da expressão do ligante Delta 4 na superfície de macrófagos após interação com leveduras de *P. brasiliensis*

Com a finalidade de estudar a capacidade do *P. brasiliensis* em modular a ativação da via de sinalização Notch por meio do ligante Delta 4, importante durante um processo inflamatório, macrófagos da linhagem J774 foram incubados na presença ou ausência de leveduras do fungo por 4 e 8h. Na análise citométrica, verificando-se a intensidade de fluorescência do anticorpo, percebe-se que após interação do fungo há diminuição da fluorescência, o que indica diminuição da expressão desse ligante na superfície das células, como visto na figura 10. Conforme demonstrado na figura 11, ao realizarmos sobreposição dos histogramas de ambos os grupos, é possível visualizar com mais clareza a diferença de fluorescência entre o grupo infectado e o grupo não infectado. Esses dados, então, foram calculados a partir da média geométrica da intensidade de fluorescência obtida, com os quais é possível evidenciar a diminuição da expressão do ligante Delta 4 na superfície de macrófagos após interação de 4 e 8h com leveduras do *P. brasiliensis* (Figura 12). Apesar de observarmos diminuição da expressão desse ligante, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Figura 10. Análise citométrica do ligante Delta 4 na superfície de macrófagos após interação com *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8h. Após esse período, as células foram marcadas com anti-Delta 4 e reveladas com anticorpo secundário conjugado a FITC e, por fim, analisadas no FACS Canto II. (a), (b) e (c) representam a análise realizada após 4h de interação entre os macrófagos e o fungo. (d), (e) e (f) representam a análise realizada após 8h de interação entre os macrófagos e o fungo. Como controle, usou-se células sem marcação. Resultado representativo de dois experimentos.

Figura 11. Detecção citométrica do ligante Delta 4 em macrófagos após interação com *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8h. Após esse período, as células foram marcadas com anti-Delta 4, reveladas com anticorpo secundário conjugado a FITC e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Como controle, utilizou-se células sem marcação. Resultado representativo de dois experimentos.

Figura 12. Expressão de Delta 4 na superfície de macrófagos após interação com leveduras de *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8h. Após esse período, as células foram marcadas com anti-Delta 4, reveladas com anticorpo secundário conjugado a FITC e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Resultado representativo de dois experimentos.

4.3 Análise da viabilidade de macrófagos após interação com leveduras de *P. brasiliensis* por 4 e 8 horas

De modo a constatar que a diminuição da expressão do receptor Notch 1 e do ligante Delta 4 na superfície das células em interação com leveduras do *P. brasiliensis* não foi ocasionada por morte celular, mas sim pelo próprio fungo, realizamos o ensaio de viabilidade celular através do PI (iodeto de propídeo), marcador nuclear que penetra exclusivamente nas células com a membrana celular danificada, ou seja, que estão mortas ou morrendo. Nesse ensaio, realizamos o mesmo procedimento para marcação de Notch 1 e Delta 4, nas quais as células foram interagidas com o fungo na proporção de 1:1 por um período de 4 e 8h. Posteriormente, foram marcadas com PI e analisou-se a morte celular por citometria de fluxo. A leitura foi realizada em FACS Canto II e a análise realizada em software FlowJo. Através da figura 13, percebe-se que o fungo não foi citotóxico para as células, ou seja, a viabilidade celular se manteve em aproximadamente 70% por 4h e 80% por 8h na ausência ou presença do fungo. Dessa forma, podemos sugerir que a diminuição da expressão, tanto do receptor Notch 1 quanto do ligante Delta 4 na superfície de macrófagos, foi ocasionada pelo possível contato com o fungo, não sendo proveniente da morte celular. As figuras 14 e 15 representam a análise citométrica realizada na determinação da viabilidade celular.

Figura 13. Viabilidade de macrófagos após interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4 e 8h. Após esse período, as células foram marcadas com PI e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Média dos resultados de dois experimentos independente.

Figura 14. Detecção citométrica da viabilidade de macrófagos após interação com *P. brasiliensis* por 4 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 4h. Após esse período, as células foram marcadas com PI e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Como controle, utilizou-se células sem marcação. Resultado representativo de dois experimentos.

Figura 15. Detecção citométrica da viabilidade de macrófagos após interação com *P. brasiliensis* por 8 horas. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) por um período de 8 h. Após esse período, as células foram marcadas com PI e, por fim, analisadas no FACS Canto II. Como controle, utilizou-se células sem marcação. Resultado representativo de dois experimentos.

4.4 Análise transcricional do receptor Notch 1 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Como foi verificado anteriormente por citometria de fluxo, o *P. brasiliensis* foi capaz de promover diminuição na expressão do receptor Notch 1 na superfície dos macrófagos, por isso realizamos o ensaio de PCR em tempo real para verificarmos a níveis transcricionais a influência que o fungo exerce no receptor Notch 1. Conforme se pode observar na figura 16, houve aumento dos níveis de transcritos de receptor Notch 1 em macrófagos previamente estimulados com LPS após interação de 24h com leveduras do fungo.

Figura 16. Análise transcricional do receptor Notch 1 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 24h de infecção, observou-se aumento dos níveis de transcritos do receptor Notch 1. 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 ($\Delta\Delta CT$ – ciclo linear). Média dos resultados de três experimentos independentes. ($P < 0,0001$).

4.5 Análise transcricional do ligante Delta 4 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Sabendo que a via de sinalização Notch só é ativada quando existe a interação entre ligante e receptor, e que o ligante Delta, em específico, parece ser o principal ligante de macrófagos envolvido em processos inflamatórios, verificamos a transcrição do ligante Delta 4 após 24h de interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Como demonstrado na figura 17, existe diminuição da transcrição desse ligante após interação com o fungo. Quando as células são previamente estimuladas com LPS, esse perfil de diminuição do ligante na presença do fungo permanece, sendo estatisticamente significativo.

Figura 17. Análise transcricional do ligante Delta 4 em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 24h de infecção, observou-se diminuição dos níveis de transcritos do ligante Delta 4. 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 ($\Delta\Delta CT$ – ciclo linear). Média dos resultados de três experimentos independentes. ($P < 0,0001$).

4.6 Análise transcricional de NF- κ B em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Tendo conhecimento que a via de sinalização Notch pode ativar genes envolvidos na resposta inflamatória e imune, realizamos o PCR em tempo real do NF- κ B, um fator de transcrição importante envolvido nas respostas imune (inata e adaptativa) e inflamatória. Monsalve e colaboradores (2009) demonstraram que esse fator de transcrição está relacionado com a ativação da via de sinalização Notch. Dessa forma, resolvemos verificar se existe uma relação entre Notch e NF- κ B no nosso modelo experimental da PCM. Como demonstrado na figura 18, o *P. brasiliensis* é capaz de promover o aumento da transcrição de NF- κ B quando os macrófagos são estimulados com LPS e sofrem inibição da via de Notch concomitantemente, porém essa diferença observada não foi estatisticamente significativa. Sem o estímulo prévio de LPS e inibição de Notch pelo DAPT, não há transcrição do NF- κ B, sugerindo que ao ativar a via, o fungo não ativa o NF- κ B.

Figura 18. Análise transcricional de NF- κ B em macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 24h de infecção, observou-se aumento dos níveis de transcritos de NF- κ B, na presença de LPS/DAPT. 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 ($\Delta\Delta$ CT – ciclo linear). Média dos resultados de dois experimentos independentes. ($P < 0,0001$).

4.7 Análise transcricional de *hes 1* macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Hu e colaboradores (2008) demonstraram a importância de *hes 1* (gene alvo da via de Notch) na regulação de citocinas que modulam a transição entre sistema imune inato e adaptativo. Dessa forma, realizamos o PCR em tempo real desse gene alvo de Notch com o intuito de analisar a relevância desse gene na resposta imune contra o *P. brasiliensis*. Podemos verificar, conforme a figura 19, que em todas as condições nas quais as células foram submetidas, o fungo foi capaz de reprimir a transcrição desse gene, indicando que a infecção pelo *P. brasiliensis* não promove a ativação desse gene. Apenas quando as células foram estimuladas com LPS, pode-se verificar um ligeiro aumento da transcrição de *hes 1*.

Figura 19. Análise transcricional de *hes 1* macrófagos, previamente estimulados ou não com LPS e/ou DAPT, após 24 horas de interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 24h de infecção, observou-se diminuição dos níveis de transcritos de *hes 1*. 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 ($\Delta\Delta CT$ – ciclo linear). Resultado representativo de um experimento. ($P < 0,0001$).

4.8 Ensaio de Fagocitose

Com o intuito de verificar se a inibição da via de Notch é capaz de interferir no processo de fagocitose promovido pelos macrófagos, realizamos uma cinética de interação para determinar o índice de fagocitose. Após a infecção *in vitro* das células cultivadas por leveduras de *P. brasiliensis*, a análise das lamínulas por microscopia revelou a presença de fagocitose em todos os grupos e tempos estudados, porém, em diferentes proporções. Assim, as células foram capazes de fagocitar as leveduras a partir de 4h de interação. (Figuras 20 e 21).

4.8.1. Fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos.

Como pode ser observado na figura 16, em todos os tempos de interação dos macrófagos com as leveduras do *P. brasiliensis*, as células foram capazes de fagocitar as leveduras.

Figura 20. Fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos J774, observada por microscopia. (b), (c), (d) Perfil das células após 4h, 12h e 24h de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* na proporção (1:1). As setas apontam as leveduras internalizadas. (a) Perfil das células não infectadas. Coloração de Giemsa. Aumento de 1000x. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.8.2. Fagocitose após inibição da via de Notch, utilizando-se o inibidor farmacológico DAPT (inibidor γ -secretase) 24h antes da interação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Na presença do inibidor da via de Notch, DAPT, as células mantiveram a capacidade de fagocitar as leveduras do fungo em todos os tempos de interação. Entretanto, constatou-se que as células apresentaram maior capacidade fagocítica, visto que foi possível verificar maior quantidade de leveduras internalizadas no interior dos macrófagos.

Figura 21. Fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos J774 após inibição da via de Notch, observada por microscopia. (a), (b), (c), (d) Perfil das células após 4h, 12h e 24h de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* na proporção (1:1). As setas apontam as leveduras internalizadas. Coloração de Giemsa. Aumento de 1000x. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.8.3. Índice de Fagocitose após inibição da via de Notch, utilizando-se o inibidor farmacológico DAPT (inibidor γ -secretase) 24h antes da interação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Foi possível verificar que os macrófagos possuem capacidade de fagocitar as leveduras do *P. brasiliensis* durante os três horários de interação. Porém, ao inibirmos farmacologicamente a via de Notch, utilizando para isso o DAPT (inibidor γ -secretase), constatamos que os macrófagos passam a apresentar uma maior capacidade fagocítica, que aumenta conforme aumento do tempo de interação entre as células e as leveduras do fungo. Isso pode ser verificado através da figura 22.

Figura 22. Índice de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos J774 após inibição da via de Notch, observada por microscopia. Análise das lamínulas por microscopia de 100 células viáveis por amostra. Índice de fagocitose calculado através da multiplicação da proporção de células viáveis que fagocitaram pelo número médio de leveduras fagocitadas. Resultado representativo de três experimentos. ($P < 0,0001$).

4.9. Dosagem de citocinas

Seguindo o segundo objetivo do trabalho, era necessário verificar a influência que o inibidor da via de Notch exerce sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, realizamos o ensaio de ELISA de captura das principais citocinas pró-inflamatórias.

4.9.1. Dosagem de IL-6

Sabendo que a IL-6 é uma citocina com papel importante na regulação do sistema imune, hematopoiese, inflamação e oncogênese, e que sua produção pode ser relacionada com o reconhecimento de patógenos por receptores de reconhecimento padrão (PRR), decidimos verificar se existe alguma influência da via de sinalização Notch na produção dessa citocina. Através da figura 23, podemos perceber que, quando os macrófagos são previamente estimulados com LPS e depois interagidos com o fungo, ocorre aumento da produção de IL-6 nos tempos 12 e 24h. Mas, ao adicionarmos o DAPT (inibidor da via de Notch), ocorre diminuição da produção dessa citocina, nesses mesmos horários.

Figura 23. Perfil de secreção de IL-6 por macrófagos após interação de 4, 12 e 24 h com leveduras de *P. brasiliensis*, na presença ou ausência de LPS/DAPT. Aplicação da técnica de ELISA de captura para mensuração dos níveis da citocina IL-6 no sobrenadante do ensaio de cinética de fagocitose entre macrófagos e leveduras de *P. brasiliensis*. Resultado representativo de três experimentos. ($P < 0,001$).

4.9.2. Dosagem de TNF- α

TNF- α é uma citocina produzida por diferentes tipos celulares, sendo um agente pró-inflamatório potente, rapidamente liberada no início da infecção, e que regula diversas funções dos macrófagos. Dessa forma, resolvemos analisar se o inibidor da via de Notch pode interferir na produção dessa citocina. Através da figura 24, podemos verificar que quando o macrófago é previamente estimulado com LPS, existe diminuição da produção de TNF- α . Porém, ao adicionarmos o DAPT, percebemos que ocorre aumento dessa citocina, principalmente, após 12h de interação entre o fungo e as células.

Figura 24. Perfil de secreção de TNF- α por macrófagos após interação de 4, 12 e 24 h com leveduras de *P. brasiliensis*, na presença ou ausência de LPS/DAPT. Aplicação da técnica de ELISA de captura para mensuração dos níveis da citocina TNF- α no sobrenadante do ensaio de cinética de fagocitose entre macrófagos e leveduras de *P. brasiliensis*. Resultado representativo de três experimentos. ($P < 0,001$).

4.9.3. Dosagem de IL-10

A IL-10 é considerada a citocina anti-inflamatória mais importante produzida por monócitos/macrófagos, sendo capaz de diminuir a liberação de mediadores inflamatórios e inibir a apresentação de antígenos. Assim, verificamos a importância dessa citocina no contexto de inibição da via de Notch. Analisando a figura 25, percebemos que essa citocina não possui muita relevância no contexto analisado. Podemos constatar que, quando os macrófagos são estimulados com LPS, não há produção de IL-10.

Figura 25. Perfil de secreção de IL-10 por macrófagos após interação de 4, 12 e 24 h com leveduras de *P. brasiliensis*, na presença ou ausência de LPS/DAPT. Aplicação da técnica de ELISA de captura para mensuração dos níveis da citocina IL-10 no sobrenadante do ensaio de cinética de fagocitose entre macrófagos e leveduras de *P. brasiliensis*. Resultado representativo de dois experimentos. ($P < 0,001$).

Discussão

---

5. DISCUSSÃO

A indução de uma resposta imune durante um processo infeccioso é inicialmente reconhecida por células do sistema imune inato, que rapidamente conseguem reagir contra o patógeno por meio de citocinas pró-inflamatórias e da ativação do sistema imune adaptativo. Os macrófagos reconhecem os patógenos por intermédio dos PRRs, consideradas células essenciais no desencadeamento de uma resposta imune efetiva. A resposta imune iniciada por essas células é uma forma de proteção contra os patógenos e pode promover a ativação do sistema imune adaptativo. Os macrófagos, quando ativados, são extremamente inflamatórios e produzem citocinas e mediadores químicos importantes no processo inflamatório e na ativação de células do sistema imune.

A resposta inflamatória é orquestrada por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6. Essas citocinas regulam a morte celular em tecidos inflamados, modificam a permeabilidade endotelial e recrutam células do sistema imune para o local da inflamação.

Durante o processo infeccioso, é necessária uma regulação apropriada da produção de citocinas para o controle da inflamação e da infecção; entretanto, uma resposta inapropriada pode provocar sepse, inflamação crônica, doenças autoimunes e câncer. É nesse contexto que a sinalização Notch entra, pois está envolvida na resposta inflamatória de macrófagos, e sua supressão por inibidores farmacológicos demonstrou a influência dessa via em mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-6. Nosso estudo buscou verificar a influência que essa via de sinalização poderia exercer na resposta imune de macrófagos contra o *P. brasiliensis*, e se o fungo seria capaz de condicionar a ativação dessa via, favorecendo o processo infeccioso.

A resposta imune contra fungos funciona com dois propósitos: (a) atividade antifúngica direta e efetora, ao promover a destruição do patógeno por meio do processo de fagocitose, o que incentiva uma resposta imune inata celular contra fungos que residem intracelularmente, ou mediante secreção de compostos microbicidas contra elementos fúngicos; (b) instruir células do sistema imune adaptativo, por intermédio da produção de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores químicos (ROMANI, 2004).

No presente trabalho, demonstrou-se que a infecção de leveduras do *P. brasiliensis* é capaz de promover alteração da expressão e da transcrição do receptor Notch 1 e do ligante Delta 4 em macrófagos, interferindo na modulação da resposta

imune por essas células, durante os processos infeccioso e inflamatório. Foi possível verificar que, em 4 e 8 horas após a interação das células com as leveduras do fungo, houve diminuição da expressão do receptor Notch 1 e do ligante Delta 4 nos macrófagos. Realizamos, também, um ensaio de viabilidade celular, com a finalidade de verificar se essa diminuição não estava relacionada à morte celular. Nossos resultados indicaram que houve aproximadamente 20% de morte celular. Supomos — importa ressaltar — que a diminuição da expressão do receptor e do ligante em macrófagos foi provocada pela interação com o fungo e não estava relacionada com a morte das células. Durante a sinalização Notch, o NICD é translocado até o núcleo, por mecanismos que envolvem a regulação de proteólise de transmembrana (RIP), a qual tem a capacidade de remover o receptor da superfície da célula. Assim, cada molécula de Notch é capaz de promover a transdução do sinal uma única vez, interferindo na regulação do número de receptores na superfície celular. E, como essa sinalização não utiliza mensageiros secundários, não é possível realizar amplificação do sinal. Ademais, essa transmissão dependerá da quantidade de NICD presente no núcleo (FIOR; HENRIQUE, 2009). Diversos estudos vêm demonstrando que a endocitose e o tráfego intracelular do receptor são extremamente importantes no mecanismo de ativação dessa via. Um mecanismo que regula esse processo é a ubiquitinação, por ubiquitinas ligases, pois são capazes de controlar a disponibilidade do receptor na membrana, assim como a força e a duração do sinal transmitido. Entretanto, em outro estudo, realizado com *C. elegans*, constatou-se que a remoção do receptor Notch na superfície da célula é um pré-requisito para o aumento da capacidade de sinalização da célula, pois permite que ocorram interações do tipo *cis* entre o receptor e o ligante (SHAYE; GREENWALD, 2005). Com base nesse estudo, é possível afirmar que a diminuição da expressão do receptor Notch 1, por nós observada, seja um mecanismo que promove maior ativação da via em questão, por permitir o aumento da capacidade de sinalização do mencionado mecanismo.

Também foi possível constatar que, na presença do fungo, por 24 horas, há aumento dos níveis de transcrição do receptor Notch 1 e diminuição da transcrição do ligante Delta 4 em macrófagos estimulados com LPS. Essa constatação indica que o fungo ativa essa via de sinalização por meio do receptor Notch 1, e o ligante parece não estar envolvido nesse processo. Entretanto, a análise transcricional do fator de transcrição NF- κ B evidenciou que o fungo, sozinho, não é capaz de induzir à transcrição desse fator, nem na presença do LPS. Porém, quando os macrófagos são estimulados com LPS e sofrem inibição da via de Notch, ocorre aumento dos níveis de transcritos após a interação com o fungo. Nossos resultados denotam que a

transcrição de NF- κ B, durante o processo infeccioso, ocorre na ausência de Notch, diferentemente do que foi observado por Monsalve e colaboradores (2009), segundo os quais a atividade de Notch 1 aumenta a ativação de NF- κ B em macrófagos, quando estimulados com LPS — favorecendo, assim, a expressão de genes implicados na resposta inflamatória, como citocinas (TNF- α , IL-6) ou enzimas efetoras (iNOS, por exemplo). Estudos vêm revelando, no entanto, a importância de Delta 4 na transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, como MAPK e NF- κ B (FUNG et al., 2007). Portanto, supõe-se que, na presença de Notch, o fungo evita que ocorra a transcrição de NF- κ B, impedindo indiretamente a expressão de genes importantes da resposta inflamatória. Por outro lado, a ausência de NF- κ B pode estar relacionada à diminuição de Delta 4, pois sua ausência impede que haja transcrição desse fator.

Outtz e colaboradores (2010) notaram que uma deleção de Notch 1 em camundongos levou à diminuição do recrutamento de macrófagos para o local da infecção. Também foi demonstrado que camundongos deficientes em Notch 1 são deficientes na resposta inflamatória; isso aponta para uma evidência genética de que Notch 1 tem um papel fundamental na regulação da resposta inflamatória de macrófagos. Portanto, Notch 1 pode exercer um papel importante na atividade de macrófagos no contexto da inflamação; assim, é possível dizer que, ao inibirmos a ativação dessa via com o inibidor farmacológico, haja uma interferência no desencadeamento de uma resposta inflamatória protetora contra o fungo.

Ainda no que toca à inibição de Notch, evidenciamos que a fagocitose de leveduras do fungo por macrófagos tornou-se mais eficiente, visto que houve aumento do índice de fagocitose na presença de Notch. Essa maior capacidade de fagocitose que as células demonstraram pode estar relacionada ao aumento de TNF- α , observado na ausência de Notch. É sabido que a TNF- α é uma citocina importante para a ativação de macrófagos, e seu aumento é capaz de ativá-los e de permitir que passem a apresentar um papel fagocítico maior. Demonstramos, assim, que a ativação de Notch 1 exercida pelo fungo é capaz de dificultar o processo de fagocitose, o que pode implicar um agravamento da infecção.

De acordo com Monsalve e colaboradores (2009), a atividade de Notch 1 aumenta a ativação de NF- κ B em macrófagos pré-estimulados com LPS, favorecendo a expressão de genes implicados na resposta inflamatória, como as citocinas TNF- α e IL-6. Entretanto, nossos resultados indicaram que a interação entre as leveduras do fungo e os macrófagos não promovem transcrição do NF- κ B, mesmo quando as células são previamente estimuladas com LPS, e que, sem a ativação do NF- κ B, não

há secreção de TNF- α de maneira significativa. Esses dados evidenciam que o desencadeamento da resposta inflamatória foi comprometido, pois uma citocina importante nessa situação não foi secretada.

Ao voltarmos ao contexto de inibição da via de Notch, verificamos que a ausência da sinalização permite que haja transcrição do NF- κ B em macrófagos previamente estimulados com LPS e que interagiram com leveduras do fungo. Observamos ainda que essa ativação do NF- κ B permitiu a secreção da citocina TNF- α , importante para o controle da infecção. Esses dados corroboram os resultados da fagocitose, segundo os quais o aumento desse processo ocorreu exatamente na ausência de Notch e em conjunto com TNF- α .

Em um estudo realizado por Ito e colaboradores (2012), demonstrou-se que o ligante Delta 4 é positivamente regulado em células dendríticas, durante o processo de infecção por micobactérias. Porém, quando Delta 4 é bloqueado *in vivo*, durante a formação do granuloma pulmonar nessa infecção, foi possível observar que ocorrem a diminuição significativa de células Th17 e o aumento do granuloma formado. Em experimentos *in vivo* com um anticorpo anti-Delta 4, houve um bloqueio específico da produção de IL-17, enquanto uma superexpressão do Delta 4 permitiu aumento de IL-17. Esse estudo sugeriu, então, que Delta 4 tem a habilidade de regular uma resposta do tipo Th17 e, por isso, é importante na modificação e no controle da resposta imune induzida por um fenótipo Th17, tanto em bactérias como em infecções fúngicas. Resultado semelhante foi demonstrado por Keerthivasan e colaboradores (2011). De acordo com esses pesquisadores, Notch 1 estava ativado em células com perfil Th17. Ainda segundo os mencionados autores, ao bloquear-se o Notch houve diminuição da produção de citocinas, como a IL-17. É válido afirmar, assim, que a diminuição da transcrição do ligante Delta 4 verificada em nossos estudos pode interferir no direcionamento de células T, impedindo que os linfócitos adquiram o fenótipo Th17, importante na resposta imune contra o fungo e, dessa forma, culminar com o estabelecimento da infecção pelo *P. brasiliensis*.

Hu e colaboradores (2008) mostraram que TLR e Notch cooperam na modulação dos genes alvos de Notch, os quais, portanto, são aptos a modular as respostas imunes. Sabemos que *hes 1* e *hey 1* são genes-alvo de Notch capazes de inibir a sinalização Notch, funcionando como reguladores dessa via de sinalização. Sua ativação ocorre após o início de ativação da via de Notch. Com base nesses estudos, nossos resultados da transcrição de *hes 1* indicam uma tendência na repressão desse gene, quando ocorre interação entre macrófagos e leveduras do

fungo em estudo. E esse perfil persiste mesmo quando estimulamos os macrófagos com LPS e inibimos a via de Notch. Podemos supor, por conseguinte, que exista algum mecanismo empregado pelo fungo para impedir que ocorra a regulação da via por meio de *hes 1*. Assim, o funcionamento desse mecanismo deve ser investigado em trabalhos futuros.

No processo de ativação da via de Notch, após a clivagem do NICD, este é translocado até o núcleo, onde se associa ao fator de transcrição CSL ou RBP-J, o qual é capaz de ativar genes envolvidos na resposta inflamatória (figura 26).

Figura 26. Receptores Notch são expressos na superfície de células como proteínas heterodiméricas. São compostos por um domínio extracelular e um domínio intracelular. A sinalização só se inicia com a interação ligante-receptor que induz duas clivagens proteolíticas sucessivas, promovendo a liberação do NICD e ativação da via.

De acordo com Hu e colaboradores (2008), o RBP-J regula positivamente a produção de IL-6, enquanto *hes 1* modula negativamente essa produção; e isso ocorre quando existe um coestímulo de TLR. Além disso, TLR consegue ativar RBP-J e também regular a produção de IL-6, conforme se pode observar na figura 23. Nossos dados evidenciam duas situações: (1) Quando os macrófagos são estimulados com LPS, existe aumento da produção de IL-6, tanto na ausência como na presença do fungo, o que confirma os dados de Hu e colaboradores (2008).

(2) Quando existe a inibição de Notch, mesmo na presença de LPS, ocorre diminuição da produção de IL-6, evento justificado pelo fato de a ausência de Notch não promover a ativação de RBP-J, culminando com a supressão de IL-6. Isso, porém, é balanceado pela ativação de TLR por meio do LPS. Dessa maneira, podemos supor que é necessária a ativação de ambas as vias para que haja a produção de IL-6.

Entretanto, Palaga e Wongchana (2011) demonstraram que o RBP-J (CSL) é capaz de ligar-se ao DNA na região promotora de IL-6, regulando diretamente a produção de IL-6, mas impede que o NF- κ B tenha acesso a esse promotor. Assim, a ativação de Notch 1 (observável pelo aumento de transcrição do receptor Notch 1) é capaz de ativar o RBP-J e induzir à produção de IL-6; porém, essa produção somente passa a ser relevante, quando temos coestímulo da via de TLR (por meio do LPS).

Figura 27. Ligantes de TLR ativam sinalização canônica de Notch. TLR ativa RBP-J via MAP kinase e IKK β , sendo de maneira independente da ativação de Notch. O RBP-J, por sua vez, direciona a transcrição de IL-6 e é capaz de ativar os genes *hes 1* e *hey 1*, que vão suprimir a expressão de IL-6 e direcionar a ativação de TNF- α (HERTOZOG, 2008).

Entender o papel das citocinas na atividade de macrófagos contra o *P. brasiliensis* é extremamente importante para elucidar os mecanismos de defesa contra a paracoccidiodomicose, especialmente nos estágios iniciais da infecção. A IL-6 é uma citocina extremamente importante nos processos infeccioso e inflamatório. Como demonstrado por Siqueira e colaboradores (2009), IL-6 parece contribuir para a patogênese da infecção com a cepa virulenta do *P. brasiliensis*, ao promover o crescimento do fungo nos estágios iniciais de fagocitose. Esse efeito de desativação da IL-6 em macrófagos, com consequente aumento do crescimento do fungo, já foi descrito em outros estudos feitos com microrganismos intracelulares, que induzem à síntese de IL-6 por células fagocíticas. Assim, nossos resultados evidenciaram que o fungo tem a capacidade de promover a produção de IL-6 via TLR-Notch, fazendo-nos

supor que essa citocina seja importante para o estabelecimento da doença, por ser benéfica para o fungo e prejudicar o hospedeiro.

De acordo com Bermudez e colaboradores (1992) e Siqueira e colaboradores (2009), o aumento da produção de IL-6 depende da regulação negativa de TNF- α em macrófagos. A produção inicial de IL-6 pode inibir eficientemente a produção de TNF- α e, em decorrência, prejudicar a atividade fungicida de monócitos contra a cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Nossos dados demonstram que, concomitantemente ao aumento da produção de IL-6, quando macrófagos são estimulados com LPS, existe diminuição da produção de TNF- α , permitindo que o fungo consiga sobreviver no interior dos macrófagos. Tal constatação corrobora os estudos anteriormente realizados com *Cryptococcus neoformans*, em que IL-6 passou a ser considerado um fator de crescimento de patógenos, funcionando como mecanismo de virulência.

Altos níveis de TNF- α são detectados após a estimulação de macrófagos por microrganismos como *Cryptococcus Neoformans*, *Coccidioides immitis* e *P. brasiliensis*, sugerindo que essa citocina pode ser essencial na defesa do hospedeiro contra esses agentes infecciosos. Sabe-se que a citocina tem um papel importante na atividade microbicida de macrófagos, trabalhando em sinergismo com IFN- γ , contra diversos patógenos, como o *Histoplasma capsulatum* (SIQUEIRA et al., 2009). Nossas observações permitem-nos deduzir que a queda de produção de TNF- α , quando a via de Notch encontra-se ativada, influencia na atividade microbicida dos macrófagos, o que se evidencia pelos índices baixos de fagocitose.

É conhecido que o IL-10 tem efeito importante na regulação das respostas inflamatória e imunológica, ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos. Siqueira e colaboradores (2009) detectaram baixos níveis dessa citocina, quando monócitos eram pré-tratados com IL-6, indicando que IL-6 e TNF- α podem exercer um efeito inibitório na produção de IL-10, como já foi demonstrado por Levitz e colaboradores (1996). Os dados que obtivemos acerca dessa citocina corroboram os de Siqueira e colaboradores (2009), visto que detectamos níveis muitos baixos de IL-10 durante os períodos de interação entre macrófagos e leveduras do fungo. Esses resultados demonstram que a resposta de macrófagos contra o *P. brasiliensis* depende de um equilíbrio entre as citocinas inibitórias e as estimulatórias.

Nosso estudo evidenciou, enfim, que o fungo, ao induzir a ativação da via de Notch, simultaneamente com TLR em macrófagos, interfere na transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória e no padrão de citocinas secretadas pelas células, de modo a desencadear a infecção.

O sistema de defesa do hospedeiro, entre os quais TLR e Notch, parece ter um papel crucial na resposta contra patógenos, principalmente nos estágios iniciais da infecção. As interações entre TLR e Notch proporcionam um foco adicional para explorar a importância desse tipo de interação em doenças crônicas como a paracoccidioidomicose. Entender os mecanismos específicos de interação entre essas duas vias de sinalização é importante para compreender o balanço entre as citocinas e os possíveis mecanismos pelos quais os patógenos, como o *P. Brasiliensis*, podem provocar infecções e outras doenças.

Com base nos citados resultados, sugerimos que o *P. brasiliensis* utiliza a via de sinalização Notch como um mecanismo de escape. A interação entre as leveduras do fungo e os macrófagos estimula a ativação dessa via, por meio do receptor Notch 1, induzindo a maior produção de IL-6, citocina importante para o crescimento do fungo no hospedeiro (SIQUEIRA et al., 2009), em conjunto com a diminuição de TNF- α , prejudicando a atividade fungicida dos macrófagos.

Conclusão

---

6. CONCLUSÃO

- ✓ Leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de ativar a sinalização Notch, através do receptor Notch 1;
- ✓ Ocorre diminuição dos níveis de transcritos do ligante Delta 4 em macrófagos após interação com leveduras do *P. brasiliensis* por 24 h;
- ✓ Ausência da sinalização Notch em macrófagos favorece o processo de fagocitose;
- ✓ Estímulo com LPS e ausência da sinalização Notch em macrófagos, após 24 h de interação com leveduras do *P. brasiliensis*, promove aumento da transcrição de NF- κ B;
- ✓ Estímulo com LPS e ausência da sinalização Notch em macrófagos, após 24 h de interação com leveduras do *P. brasiliensis*, promove diminuição da transcrição de *hes 1*;
- ✓ Interação de macrófagos, previamente estimulados com LPS, com leveduras de *P. brasiliensis* por 24 h, promove aumento da secreção de IL-6;
- ✓ Na ausência da sinalização Notch ocorre diminuição da secreção de IL-6 e aumento da secreção de TNF- α ;
- ✓ Interação de macrófagos, previamente estimulados com LPS, com leveduras de *P. brasiliensis* por 24 h, promove diminuição da secreção de TNF- α .

Esses resultados indicam que leveduras do *P. brasiliensis* são capazes de modular a via de sinalização Notch em macrófagos, como mecanismo de escape, de modo a favorecer a patogênese da infecção. Através da ativação de Notch 1, ocorre aumento da secreção de IL-6 e diminuição de TNF- α . Entretanto, na ausência da ativação de Notch, ocorre diminuição da secreção de IL-6 com aumento de TNF- α e favorecimento do processo de fagocitose.

Referências Bibliográficas

---

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, M.; LIBBY, P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. **Cardiovascular Pathology**, v.13, p.125–138, 2004.

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidiódico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.5, p.135-141, 1930.

ALMEIDA, S.M. Central nervous paracoccidioidomycosis: an overview. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.126-133, 2005.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infection and Immunity**, v.66, p.5587-5591, 1998.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; COCK, A.M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Medical Mycology**, v.40, p.169-178, 2002.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.505-512, 1998.

BASTOS, K.B.; ÁLVAREZ, J.M.; MARINHO, C.R.F.; RIZZO, L.V.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **Journal of Leukocyte Biology**, v.71, p.271-278, 2002.

BERBERT, A.L.C.V.; FÁRIA, G.F.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; SILVA, M.M.M.D.; MINEO, J.R.; LOYOLA, A.M. Histological and serological evidence of experimental paracoccidioidomycosis in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **International Journal of Experimental Pathology**, v.88, p.55-62, 2007.

BERMUDEZ, L.E.; WU, M.; PETROFSKY, M.; YOUNG, L.S. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor – mediated mycobacteriostatic and micobactericidal activities in macrophages. **Infection and Immunity**, v.60, n.10, p.4245-52, 1992.

BERNARD, G.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis. In: MERZ, W.G.; HAY, R.J., eds. **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections: medical mycology**. 10.ed. London: Hodder Arnold, 2001. p.541-559.

BITTENCOURT, J.; OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, p.1856-1864, 2005.

BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAODARNOU, P.M.O.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brasil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.390-394, 1999.

BORELLI, D. Significance of dimorphism of various parasitic fungi. **Mycopathologia & Mycologia Applicata**, v.46, n.3, p.237-239, 1972.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.2, p.80-87, 2002.

BORGREFFE, T.; OSWALD, F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.1631-1646, 2009.

BOZZI, A.; REIS, B.S.; PRADO, F.L.S.; PEDROSO, E.P.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.60, p.500-505, 2004.

BOZZI, A.; PEREIRA, P.P.N.; REIS, B.S.; GOULART, M.I.; PEREIRA, M.C.N.; PEDROSO, E.P.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. **Human Immunology**, v.67, p.931-939, 2006.

BRITO, T.; FRANCO, M.F. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.36, n.2, p.185-192, 1994.

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Immunology**, v.140, n.8, p.2786-2789, 1988.

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.57, p.2289-2294, 1989.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

CALICH, V.L.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptibility and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.5, p.615-623, 1998.

CALVI, S.A.; PERAÇOLI, M.T.S.; MENDES, R.P.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MARQUES, S.A.; SOARES, A.M.V.C. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, v.5, p.107-113, 2003.

CAMPOS, M.R.M.; RUSSO, M.; GOMES, E.; ALMEIDA, S.R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes and Infection**, v.8, n.2, p.372-379, 2006.

CANO, L.E.; GOMEZ, V.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibitory effect of deferozamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infection and Immunity**, v.60, p.1494-1496, 1994.

CANO, L.E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C.F.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C.; CALICH, V.L.G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.66, p.800-806, 1998.

CANO, L.E.; GONZALEZ, A.; LOPERA, D.; NARANJO, T.W.; RESTREPO, A. Pulmonary paracoccidioidomycosis: clinical, immunological and histopathological aspects. In: IRUSEN, E.M., ed. **Lung diseases**: selected state of the art reviews. S.l.: InTech, 2012. cap.16, p.359-392. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/lung-diseases-selected-state-of-the-art-reviews/pulmonary-paracoccidioidomycosis-clinical-immunological-and-histopathological-aspects>. Acesso em: 28 de jun. 2012.

CARLESSO, N.; ASTER, J.C.; SKLAR, J.; SCADDEN, D.T. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. **Blood**, v.93, p.838–848, 1999.

CONTI-DIAZ, I.A.; RILLA, F.D. Hipotesis sobre el nicho ecologico del *Paracoccidioides brasiliensis*. [Revista Médica del Uruguay](#), v.5, n.2/3, p.97-103, 1989.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.; WANKE, B. Paeacoccidioidomycosis mortality in Brasil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, p.1441-1454, 2002.

DEL NEGRO, G.M.B.; PEREIRA, C.N.; ANDRADE, H.F.; PALACIOS, S.A.; VIDAL, M.M.S.; CHARBEL, C.E.; BENARD, G. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and cronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.49, p.37-46, 2000.

DELANEY, C.; VARNUM-FINNEY, B.; AOYAMA, K.; BRASHEM-STEIN, C.; BERNSTEIN, I.D. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta 1 on *ex vivo* differentiation and *in vivo* marrow repopulation of cord blood cells. **Blood**, v.106, p.2593-2699, 2005.

DINIZ, S.N.; REIS, B.S.; GOES, T.S.; ZOUAIN, C.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v.22, p.485-492, 2004.

FAVA, S.C.; NETTO, C.F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, n.3, p.155-164, 1998.

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

FIOR, R.; HENRIQUE, D. Notch off: a perspective on the termination of Notch signaling. **International Journal of Developmental Biology**, v.53, p.1379-1384, 2009.

FISCHER, A.; GESSLER, M. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.14, p.4583-4596, 2007.

FOLDI, J.; CHUNG, A.Y.; XU, H.; ZHU, J.; OUTTZ, H.H.; KITAJEWSKI, J.; LI, Y.; HU, X.; IVASHKIV, L.B. Autoamplification of Notch signaling in macrophages by TLR-induced and RBP-J-dependent induction of jagged 1. **Journal of Immunology**, v.185, p.5023-5031, 2010.

FONSECA, E.R.S.; PARDAL, P.P.O.; SEVERO, L.C. Paracoccidioidomicose em crianças em Belém do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.31-33, 1999.

FORTES, M.R.P.; KUROKAWA, C.S.; MARQUES, S.A.; MIOT, H.A.; MARQUES, M.E.A. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.3, p.516-525, 2011.

FRANCO, M.F.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.20, n2, p.129-132, 1987.

FRANCO, M.D.; NUNES, J.; LIPEEY, C.; LOPEZ, M.; MAWAS, C.; OLIVE, D. Regulation of CD2-mediated human T cell activation: anti-CD8 monoclonal antibodies inhibit CD2-mediated rise in intracellular calcium. **Cellular Immunology**, v.152, n.1, p.162-175, 1993.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 409p.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, v.38, p.185-191, 2000.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, n.1, p.5-18, 1994.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages and inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation & Allergy**, v.4, n.3, p.281-286, 2005.

FUNG, E.S.M.; TANG, J.P.; CANNER, K.; MORISHIGE, J.F.; ARBOLEDA-VELASQUEZ, A.A.; CARDOSO, N.; CARLESSO, J.C.; ASTER, M.; AIKAWA, M. Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. **Circulation**, v.115, p.2948-2956, 2007.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferonactivated murine macrophages. **Infection and Immunity**, v.68, n.5, p.2546-2552, 2000.

GONZALEZ, A.; ARISTIZIBAL, B.H.; GOMEZ, E.C.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Short report: inhibition by tumor necrosis factor - alfa activated macrophages of the transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide. **American Journal of Tropical Medicine**, v.71, n.6, p.828-830, 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.23-35, 2003.

GREER, D.L.; RESTREPO, E. La epidemiologia de la paracoccidioidomycosis. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.82, p.428-443, 1977.

HERTZOG, P. A notch in the toll belt. **Immunity**, v.29, n.5, p.663-665, 2008.

HU, X.; CHUNG, A.Y.; FOLDI, J.; CHEN, J.; JI, J.D. Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon-gamma pathways. **Immunity**, v.29, p.691-103, 2008.

ITO, T.; CONNETT, J.M.; KUNKEL, S.L.; MATSUKAWA, A. Notch system in the linkage of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v.92, p.1-7, 2012.

KAMINAGAKURA, E.; BONAN, P.R.; JORGE, J.; ALMEIDA, O.P.; SCULLY, C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Diseases**, v.13, n.4, p.434-439, 2007.

KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; ABRAHAMSOHN, P.A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v.2, p.119-128, 1987.

KASHINO, S.S.; FAZIOLLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, I.C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.20, p.89-97, 2000.

KEERTHIVASAN, S.; SULEIMAN, R.; LAWLOR, R.; RODERICK, J.; BATES, T.; MINTER, L.; ANGUITA, J.; JUNCADILLA, I.; NICKOLOFF, B.J.; LE POOLE, I.C.; MIELE, L.; OSBORNE, A. Notch signaling regulates mouse and human TH17 differentiation. **Journal of Immunology**, v.187, p.1-10, 2011.

KIMBLE, J.; SIMPSON, P. The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.13, p.133-361, 1997.

KODELJA, V.; MULLER, C.; TENORIO, S.; SCHEBESCH, C.; ORFANOS, C.E.; GOERDT, S. Differences in angiogenic potential of classically vs. alternatively activated macrophages. **Immunobiology**, v.197, p.478-493, 1997.

KOVALL, R.A. More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. **Oncogene**, v.27, n.38, p.5099-5109, 2008.

LACAZ, C.S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose: um pouco de história. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.; FIORILLO, A.M. **Paracoccidioidomicose**: blastomicose sul-americana. São Paulo: Sarvier, EDUSP, 1982. cap.1, p.1-7.

LACAZ, C.S. Paracoccidioidomicose. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse medico. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. cap.13, p.248-297.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.1, p.1-4.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LAZERA, C.Z.S.D. et al. Mortalidade por paracoccidioidomicose: Brasil 1980-1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2, Rio de Janeiro, 1998. **Programa e resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Micologia, 1998.

LEVITZ, S.M.; TABUNI, A.; NONG, S.H.; GOLENBOCK, D.T. Effects of interleukin-10 on human peripheral blood mononuclear cell responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v.64, p.945-951, 1996.

LIEW, F.Y.; XU, D.; BRINT, E.K.; O'NEILL, L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.446-458, 2005.

LONDERO, A.T.; RAMOS, T.C.D. Paracoccidioidomycosis: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Jornal de Pneumologia**, v.16, p.129-132, 1990.

LOOSE, D.S.; PRICE STOVER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological

response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, p.7659-7663, 1983.

LOUIE, A.; BALTCH, A.L.; SMITH, R.P.; FRANKE, M.A.; RITZ, W.J.; SINGH, J.K.; GORDON, M.A. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in murine model of systemic candidiasis. **Infection and Immunity**, v.62, p.2761-2772, 1994.

LUPI, O.; TYRING, S.K.; MCGINNIS, M.R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.53, p.931-951, 2005.

MAILLARD, I.; ADLER, S.H.; PEAR, W.S. Notch and the immune system. **Immunity**, v.19, p.781-791, 2003.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v.23, p.344-346, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophages activation and polarization. **Trends in Immunology**, v.25, p.677-686, 2004.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v.23, n.11, p.549-555, 2002.

MARQUES DA SILVA, S.H.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.; LOPES, J.D.; QUEIROZ-TELLES, F.; PIRES DE CAMARGO, Z. Detection of circulating gp 43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.3675-3680, 2003.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In: SEDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia média à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.204-221.

MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.453-461, 2008.

MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G. Mycelial to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.9, p.4055-4060, 1987.

METZER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endodontics & Dental Traumatology**, v.16, p.1-8, 2000.

MILLS, C.D.; KINCAID, K.; ALT, J.M.; HEILMAN, M.J.; HILL, A.M. Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **Journal of Immunology**, v.164, p.6166-6173, 2000.

MONSALVE, E.; PEREZ, M.A.; RUBIO, A.; RUIZ-HIDALGO, M.J.; BALADRÓN, V.; GARCIA-RAMIREZ, J.J.; GOMEZ, J.C.; DIAZ-GUERRA, M.J. Notch -1 up-regulation and signaling following macrophage activation modulates gene expression patterns known to affect antigen-presenting capacity and cytotoxic activity. **Journal of Immunology**, v.176, p.5362-5373, 2006.

MONSALVE, E.; RUIZ-GARCIA, A.; BALADRÓN, V.; RUIZ-HIDALGO, M.J.; SANCHEZ-SOLANA, B.; RIVERO, S.; GARCIA-RAMIREZ, J.J.; RUBIO, A.; LABORDA, J.; DIAZ-GUERRA, M.J.M. Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF- κ B activity. **European Journal of Immunology**, v.39, n.9, p.2556-2570, 2009.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap.13, p.320.

MORGAN, T. The theory of the gene. **American Naturalist**, v.51, p.513-544, 1917.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, p.209-212, 2003.

MUSATTI, C.C.; PERAÇOLI, M.T.S.; SOARES, A.M.V.C.; REZKALLAH-IWASSO, M.T. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.175-186.

NAIF, R.D.; FERREIRA, L.C.L.; BARRETT, T.V.; NAIFF, M.F.; RAMON ARIAS, J. Paracoccidioidomycose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.28, n.1, p.19-27, 1986.

NEVES, J. **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. In: PATRUS, O.A.; COSTA, P.U.; NEVES, J. Blastomicose sul-americana (Paracoccidioidomycose). 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983, v.68, p.825-835.

NICOL, T.; VERNON, R.B.; QUANTOCH, D.C. The influence of various hormones on the reticuloendothelial system: endocrine control of body defense. **Journal of Endocrinology**, v.33.p.365-383, 1965.

NIRANJAN, T.; BIELESZ, B.; GRUENWALD, A.; PONDA, M.P.; KOPP, J.B.; THOMAS, D.B.; SUSZTAK, K. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. **Nature Medicine**, v.14, n.3, p.290–298, 2008.

O'NEILL, L.A.J.; BOWIE, A.G. Sensing and signaling in antiviral innate immune. **Current Biology**, v.20, p.328-333, 2010.

OUTTZ, H.H.; WU, J.K.; WANG, X.; KITAJESKI, J. Notch 1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates endothelial growth factor receptor 1 and inflammatory cytokine expression in macrophages. **Journal of Immunology**, v.185, n.7, p.4363-4373, 2010.

PALAGA, T.; BURANARUK, C.; RENGPIPAT, S.; FAUQ, A.H.; GOLDE, T.E.; KAUFMANN, S.H.; OSBORNE, B.A. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophages functions. **European Journal of Immunology**, v.38, p.174-183, 2008.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S. Paracoccidioidomycosis: revisão da literatura. **Scientia Medica**, v.15, n.4, p.274-278, 2005.

POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions: an evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, v.218, p.87-94, 2002.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.23, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A.; JIMENEZ, B.E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, p.279-281, 1980.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.46, p.346-353, 1984.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.46, p.346-353, 1994.

RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v.39, p.233-241, 2001.

RESTREPO-MORENO, A. Infections agents and pathogenesis. In: MURPHY, J.W.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M., eds. **Fungal infections and immune responses**. New York, London: Plenum Press, 1993. cap.10, p.251-276.

RIVITTI, E.A.; AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clinics in Dermatology**, v.17, p.171-190, 1999.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Immunology**, v.4, p.1-13, 2004.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.56, p.711-713, 1988.

SAN BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Current Topics in Medical Mycology**, v.1, p.235-257, 1985.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.31, p.99-113, 1993.

SAN BLAS, G.; SAN BLAS, F. Molecular aspects of fungal dimorphism. **Critical Reviews in Microbiology**, v.11, p.101-127, 1985.

SAN-BLAS, G.; RESTREPO, A.; CLEMONS, K.; STEVENS, D.A.; SAN-BLAS, F.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, A.J.; BARTHOLOMEW, M.A.; HARADA, T.; FENELON, L.; HAY, R.J. Paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.30, suppl.1, p.59-71, 1992.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v.40, p.225-242, 2002.

SANTO, A.H. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.23, n.5, p.313-324, 2008.

SARRAF, P.; SNELLER, M.C. Pathogenesis of granuloma formation. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.7, n.8, p.1-2, 2005.

SCULL, C.M.; HAYS, W.D.; FISCHER, T.H. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. **Journal of Inflammation**, v.7, p.53, 2010.

SEVERO, L.C.; GEYER, G.R.; LONDERO, A.T.; PORTO, N.S.; RIZZON, C.F. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.31, n.2, p.115-118, 1979.

SHAYE, D.D.; GREENWALD, I. LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. **Development**, v.132, n.22, p.5081-5092, 2005.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.297-310, 2006.

SILVA, C.E.A.; CORDEIRO, A.F.; GOLLNER, A.M.; CUPOLILO, S.M.N.; QUESADO-FILGUEIRAS, M.; CURZIO, M.F. Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.58, n.4, p.741-747, 2000.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C.M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá. Minas Gerais. Brasil. **Medical Mycology**, v.36, p.37-42, 1998.

SIQUEIRA, K.Z.; SOARES, A.M.V.C.; DIAS-MELICIO, L.A.; CALVI, S.A.; PERAÇOLI, M.T.S. Interleukin-6 treatment enhances human monocyte permissiveness for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production. **Medical Mycology**, v.47, p.259-267, 2009.

SMITH, J.G.; MAGEE, D.M.; WILLIAMS, D.M.; GRAYBILL, J.R. Tumor necrosis factor alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Infectious Diseases**, v.162, p.1349-1353, 1990.

SOARES, D.A.; ANDRADE, R.V.; SILVA, S.S.; BOCCA, A.L.; FELIPE, S.M.S.; PETROFEZA, S. Extracellular *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. **BMC Microbiology**, v.10, p.241, 2010.

SONG, E.; OUYANG, N.; HORBELT, M.; ANTUS, B.; WANG, M.; EXTON, M.S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities on human fibroblasts. **Cellular Immunology**, v.204, p.19-28, 2000.

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **American Journal of Pathology**, v.156, p.1811-1820, 2000.

STOVER, E.P.; SCHAR, G.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelia and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.51, p.199-203, 1986.

TELLES, F. Blastomicose sul-americana: paracoccidioidomicose. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Estado de Saúde**. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/.../pcm_sesa.htm. Acesso em: 18 de jun. 2005.

VALLE, A.C.F.; COSTA, R.B.L. Paracoccidioidomicose. In: BATISTA, R.S.; IGREJA, R.P.; GOMES, A.D.; HUGGINS, D.W. **Medicina tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p.934-958.

VERGARA, M.L.; MARTINEZ, M. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.144, p.131-133, 1999.

WANKE, B. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis: an emerging health problem in the Brazilian Amazon region. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCIDIIDOMICOSE, 7, Campos do Jordão, 1999. **Resumos**. Campos do Jordão, 1999. p.39.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. v.7, p.110-113.

WENG, A.P.; ASTER, J.C. Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.14, p.48–54, 2004.

WENG, A.P.; FERRANDO, A.A.; LEE, W.; MORRIS, J.P.T.; SILVERMAN, L.B.; SANCHEZ-IRIZARRY, C.; BLACKLOW, S.C.; LOOK, A.T.; ASTER, J.C. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science**, v.306, p.269–271, 2004.

WONGCHANA, W.; PALAGA, T. Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. **Cellular & Molecular Immunology**, v.9, n.2, p.155-162, 2012.

WU, J.; BRESNICK, E.H. Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, n.10, p.477-485, 2007.

YABE, Y.; MATSUMOTO, T.; TSURUMOTO, T.; SHINDO, H. Immunohistological localization of Notch receptors and their ligands Delta and Jagged in synovial tissues of rheumatoid arthritis. **Journal of Orthopaedic Science**, v.10, n.6, p.589-594, 2005.