UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Influência de TLR3 em modelo de Paracoccidioidomicose experimental

Grasielle Pereira Jannuzzi

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Influência de TLR3 em modelo de Paracoccidioidomicose experimental

Grasielle Pereira Jannuzzi

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira

São Paulo
2017

Grasielle Pereira Jannuzzi

Influência de TLR3 em modelo de Paracoccidioidomicose experimental

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. orientador/presidente

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Karen Spadari Ferreira
Orientadora/presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

_____

3°. examinador

São Paulo, 2017.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de São Paulo, com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus avós, irmãos e pais, pelo apoio e amor dedicado.
Ao meu avô José Jannuzzi, que vive em meus pensamentos.
Ao meu "Dido" José Roberto, por todo amor e companheirismo.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota".

(Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMENTOS

À minha família, que mesmo à distância foram essenciais durante essa etapa da minha vida. É impossível imaginar ter chegado ao fim dessa jornada sem o extenso apoio e amor que recebi de vocês. À família Almeida, pelo acolhimento e por me deixarem fazer parte de suas vidas.

À Profª. Drª. Karen Spadari Ferreira, que transmitiu conhecimentos e experiências essenciais para minha formação e crescimento intelectual. Meus agradecimentos pela oportunidade, confiança e por todos esses anos trabalhando juntas.

Ao Prof. Sandro Rogério de Almeida, por todo o apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amor José Roberto, que esteve ao meu lado desde o início, sempre me incentivando e me apoiando. Obrigada também por ter contribuído intensamente para a realização dos experimentos e discussões de resultados. Quero agradecer principalmente por toda sua dedicação, seu amor, carinho e por fazer meus dias mais felizes.

À Lavínia, com quem dividi inúmeros experimentos, momentos felizes ou nem tanto, e que foi e será sempre minha parceira-amiga-irmã.

Aos colegas de laboratório Suelen Silvana dos Santos, Gilberto Kaihami, Leandro Breda, Karla Santiago, Lucas Ferreira, Luana Rossato, Telma Kimura, Nicole "nosso bebê", Roney Pereira, Pollyana Martins, Fábio Seiti, Miriam Kasai, Daniel Valério, Larissa Monteiro, Gabriela Ferrari, pelo companheirismo e pelos momentos agradáveis que passamos juntos e que ficarão em minha memória pra sempre.

À Hadassa Cristina, Anita Del Guercio, Ana Laura Boechat pela ótima convivência, risadas e experimentos que realizamos juntas.

Às técnicas Sônia Burato e Renata Albuquerque, por todos os ensinamentos, desabafos, longas conversas e risadas.

Às meninas da secretaria Dora, Edna, Marelisa, Sueli e Ana Dantas, por toda ajuda prestada nas questões burocráticas relacionadas a este trabalho.

A todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!!!

RESUMO

JANNUZZI, G.P. Influência de TLR3 em modelo de PCM experimental. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.

Os receptores do tipo *Toll* compreendem a família de receptores de reconhecimento de padrões melhor caracterizados, que podem ativar diferentes respostas imunes, dependendo de quais receptores e conjuntos de adaptadores são utilizados. Os TLRs, como TLR2, TLR4 e TLR9, e sua sinalização foram implicados no reconhecimento de *P. brasiliensis* e na regulação da resposta imune, no entanto, o papel do TLR3 ainda não está claro. Assim, a compreensão da função endossomal do TLR3 na PCM experimental é crucial. Utilizamos modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção por *P. brasiliensis*, camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$, para avaliar a contribuição da TLR3 no desenvolvimento da infecção. Mostramos que ausência de TLR3 leva o aumento de óxido nítrico e a capacidade fagocítica por macrófagos nas primeiras 4 horas de interação com leveduras *P. brasiliensis*. Mostramos ainda que os camundongos TLR3 $^{-/-}$ desempenham papel protetor após 30 dias de infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*, mostrando diminuição do aumento de CFU, perfil de resposta Th1 e Th17, bem como aumento de células citotóxicas T CD8^{+} produtoras de IFN-γ e IL-17. As células citotóxicas T CD8^{+} mostraram ser essenciais para o controle da infecção nos camundongos TLR3$^{-/-}$, uma vez que a depleção dessas células levou a progressão da doença. Em estágios iniciais, 3 e 5 dias de infecção, observamos aumento do recrutamento de neutrófilos para o pulmão. Estudos recentes indicam que o TLR3 é um receptor importante para a resposta imune na micose e sua ausência favorece a infecção por fungos. Em contraste, nossos resultados mostram que, no caso do PCM, o TLR3 é prejudicial ao hospedeiro, sugerindo que a ativação do TLR3 pode ser um possível mecanismo de escape de *P. brasiliensis*.

Palavra chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, TLR3, citotoxicidade e T CD8^{+}.

ABSTRACT

JANNUZZI, G.P. TLR3 influence in experimental PCM model. Thesis (PhD in Science). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, in 2017.

Toll-like receptors comprise the best-characterized pattern-recognition receptor family that can activate different immune responses, depending on which receptor and adaptor set are utilized. TLRs, such as TLR2, TLR4 and TLR9, and their signaling have been implicated in the recognition of *P. brasiliensis* and regulation of the immune response, however, the role of TLR3 remains unclear. Thus, understanding the endosomal function of TLR3 in experimental PCM is crucial. We used *in vitro* and *in vivo* models of infection by *P. brasiliensis*, C57Bl/6 and TLR3$^{-/-}$ mice, to assess the contribution of TLR3 on development of infection. We show that absence of TLR3 leads to increased nitric oxide and phagocytic capacity by macrophages in the first 4 hours of interaction with yeasts *P. brasiliensis*. We also showed that TLR3$^{-/-}$ mice play a protective role after 30 days of intratracheal infection with *P. brasiliensis*, showing a decrease in the CFU increase, Th1 and Th17 response profile, as well as an increase in cytotoxic CD8^{+} cells producing IFN-γ and IL-17. The cytotoxic T CD8^{+} cells were shown to be essential for the control of infection in TLR3$^{-/-}$ mice, since the depletion of these cells led to the progression of the disease. In the initial stages, 3 and 5 days of infection, we observed increased recruitment of neutrophils to the lung. Recent studies indicate that TLR3 is an important receptor for the immune response in mycosis and its absence favors fungal infection. In contrast, our results show that in the case of PCM, TLR3 is detrimental to the host, suggesting that TLR3 activation may be a possible escape mechanism of *P. brasiliensis*.

Key words: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, TLR3, cytotoxity and T CD8^{+}.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 20
1.1. Paracoccidioidomicose e seus agentes etiológicos. 20
1.2. Distribuição geográfica. 22
1.3. Contágio, PCM infecção e PCM doença. 24
1.4. Diagnóstico. 28
1.5. Tratamento. 29
1.6. Resposta imunológica e vias de sinalização. 31
2. **OBJETIVO** 40
2.1 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** 40
3. **MATERIAIS E MÉTODOS** 41
3.1 Animal 41
3.2 Fungo 41
3.3 Antígeno livre da parede do fungo (CFA) da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* ... 41
3.4 Ensaios *In vivo* 42
3.4.1 Preparação do inóculo 42
3.4.2 Infecção intratraqueal 42
3.4.3 Determinação das Unidades formadoras de colônias (UFC) 42
3.4.4 Ensaios enzimáticos 43
3.4.4.1 Produção de citocinas 43
3.4.4.2 Dosagem de imunoglobulina 43
3.4.5 Análise das populações celulares por Citometria de Fluxo 44
3.4.5.1 Obtenção de células totais do pulmão e linfonodo 44
3.4.5.2 Fenotipagem pulmonar 44
3.4.5.3 Fenotipagem do linfonodo 45
3.4.5.4 Cinética - Recrutamento de neutrófilos 46
3.4.5.5 Determinação de citocinas intracelulares de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e marcação de células T reg. 46
3.4.5.6 Estratégia de análise das populações celulares 47
3.4.6 Histopatologia 48
3.4.7 Proliferação celular 48
3.4.8 Ensaio de depleção de células T $CD8^+$ 49
3.5 Ensaios *In vitro* 50
3.5.1 Cultura de células 50
3.5.2 Ensaio de interação entre BMDM e leveduras da cepa Pb18 51
3.5.3 Ensaio de fagocitose 51
3.5.4 Determinação de Unidades Formadoras de Colônia 51

3.5.5 Dosagem de óxido nítrico (NO) 52
3.5.6 Expressão de moléculas coestimulatórias 52
3.5.7 Análise de expressão gênica 53
3.5.8 Citotoxicidade de linfócitos T $CD8^+$ 54
3.5.9 Análise Estatística 56
4. **RESULTADOS** 57
3.6 Avaliação da carga fúngica pulmonar e histopatológica 57
3.7 Caracterização de subpopulações celulares do infiltrado pulmonar 59
3.8 Perfil de citocinas pulmonares 61
3.9 Caracterização de células T nos linfonodos regionais à infecção 62
3.10 Perfil de citocinas dos linfonodos regionais à infecção 63
3.11 Dosagem dos títulos IgG total e isotipos 64
3.12 Análise intracelular de IFN-γ em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ pulmonares 65
3.13 Análise intracelular de IL-17 em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ pulmonares 67
3.14 Caracterização de células T regulatórias pulmonares 69
3.15 Análise da capacidade proliferativa de linfócitos T 70
3.16 Caracterização das populações de linfócitos pulmonares após 15 dias de infecção 71
3.17 Avaliação da citotoxicidade de linfócitos T $CD8^+$ 73
3.18 Análise da expressão de granzimas e perforinas 74
3.19 Avaliação da viabilidade das leveduras da cepa Pb18 76
3.20 Avaliação da carga fúngica pulmonar após a depleção de células T $CD8^+$ 78
3.21 Perfil de citocinas pulmonares após a depleção de células T $CD8^+$ 79
3.22 Análise do recrutamento de neutrófilos pulmonares 80
3.23 Fagocitose de BMDM 81
3.24 Análise de UFC de BMDM 82
3.25 Produção de oxido nítrico por BMDM 83
3.26 Expressão de moléculas coestimulatórias 84
3.27 Análise da expressão gênica de BMDM 85
5. **DISCUSSÃO** 86
6. **CONCLUSÕES** 96
7. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 97
8. **ANEXOS** 110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenças morfológicas de conídios e leveduras entre isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e *P. lutzii* Pb01.. 21

Figura 2. Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose. 23

Figura 3. Crianças apresentando a forma aguda da PCM.. 26

Figura 4. Jovens com a forma crônica (tipo adulto) da PCM.. 27

Figura 5. Representação esquemática da sinalização mediada por TLRs e as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF .. 36

Figura 6. Estratégia de *gate*. 48

Figura 7. Ausência de TLR3 promove redução da carga fúngica no pulmão.. 58

Figura 8. Animais TLR3$^{-/-}$ tem aumento de células T CD8 pulmonares.. 60

Figura 9. *P. brasiliensis* induz aumento de citocinas de padrão Th1 e Th17 no pulmão de camundongos TLR3$^{-/-}$.. 61

Figura 10. Camundongos TLR3$^{-/-}$ tem diminuição nas populações de células T CD8^{+} e T CD4^{+} nos linfonodos.. 62

Figura 11. Ausência de TLR3 induz aumento de produção de citocinas nos linfonodos regionais.. 63

Figura 12. Camundongos TLR3$^{-/-}$ induzem maiores níveis de IgG após infecção.. 64

Figura 13. Aumento de células T CD4^{+} e CD8^{+} produtoras de IFN-γ é observado no pulmão de camundongos TLR3$^{-/-}$. 66

Figura 14. Aumento de células T CD4^{+} e CD8^{+} produtoras de IL-17 é observado no pulmão de camundongos TLR3$^{-/-}$. 68

Figura 15. Aumento de células T regulatórias pulmonares é observado em camundongos TLR3$^{-/-}$.. 69

Figura 16. A ausência de TLR3 promove maior capacidade linfoproliferativa. 70

Figura 17. Camundongos TLR3$^{-/-}$ apresentam aumento de resposta celular após 15 dias de infecção.. 72

Figura 18. Linfócitos T CD8^{+} tem maior atividade citotóxica na ausência de TLR3.. 74

Figura 19. Linfócitos T CD8^{+} tem maior expressão de *gzmb* e *prf1* na ausência de TLR3.. 75

Figura 20. Sobrenadante de linfócitos TLR3$^{-/-}$ induzem morte das leveduras.. 77

Figura 21. Células T CD8^{+} conferem proteção à PCM na ausência de TLR3.. 78

Figura 22. A depleção de células T $CD8^+$ promove diminuição de citocinas Th1 e Th17..... 79

Figura 23. Camundongos $TLR3^{-/-}$ tem aumento no recrutamento de neutrófilos. 80

Figura 24. Fagocitose por BMDM não é alterada na ausência de TLR3. 81

Figura 25. BMDM $TLR3^{-/-}$ tem sua capacidade fungicida aumentada em 4 horas.. 82

Figura 26. BMDM $TLR3^{-/-}$ tem aumento de produção de NO.. 83

Figura 27. Diminuição da expressão de CD80, CD40 e MHC-II é observada em BMDM $TLR3^{-/-}$.. 84

Figura 28. A ausência de TLR3 não altera a expressão dos genes *myd88, tlr9, tlr4, tlr2, clec7a, mrc1, card9* e *nlrp3* em BMDM..... 85

Figura 29. Panorama geral da participação do TLR3 na resposta da PCM experimental.. 95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fenotipagem celular pulmonar. 45

Quadro 2. Fenotipagem das células do linfonodo. 46

Quadro 3. Recrutamento de neutrófilo. 46

Quadro 4. Perfil de citocinas intracelulares e de células Treg 47

Quadro 5. Caracterização de macrófagos 51

Quadro 6. Caracterização das moléculas coestimulatórias 53

Quadro 7. Caracterização de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ 55

Quadro 8. Relação de primers utilizados para análise da expressão de transcritos de perforina e granzima por Real Time-PCR 56

LISTA DE ABREVIAÇÕES

APC - Célula apresentadora de antígeno

***A. fumigattus* -** *Aspergillus fumigatus*

BHI - Brain Heart Infusion

BMDM - *Bone marrow-derived macrophages*

BSA - Albumina sérica bovina

Card9 - *Caspase recruitment domain-containing protein 9*

***C. albicans* -** *Cândida albicans*

CBB - *Coomassie Briliant Blue*

***C. neoformans* -** *Cryptococcus neoformans*

cDNA - Ácido desoxirribonucléico fita complementar

CD11b - Marcador de expressão celular para monócitos e células mieloides

CD11c - Marcador de expressão celular para monócitos e células mieloides

CD4 - Marcador de linfócitos Th1/Th2/Th17, co-receptor para molécula MHC-II

CD8 - Marcador de linfócito T citotóxico, co-receptor para molécula MHC-I

CD40 - Molécula coestimulatória presente em macrófagos, célula dendríticas, linfócito B, liga-se o CD40

CD80 - Molécula coestimulatoria ou B7, presente em monócitos, liga-se ao CD28 e CTLA-4

CD86 - Molécula coestimulatoria ou B7, presente em monócitos, liga-se ao CD28 e CTLA-4

CFA - *cell-free antigen*

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CLR - *C-type lectin receptors*

Ct - *Threshold*

CTLA-4 - *Cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4*

DC - Dendritic cell

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Óptica

ELISA - *Ebsyme-linked immunosorbent assay*

FACS - *Flourescence-activated cell sorting*

FITC - *Isotiocianato de fluoresceína*

FN - Falso negativo

FoxP3 - *Forkheard family os transcriptional regulator FoxP3*

FP - Falso positivo

FSC - *Forward scatter*, tamanho celular relativo

H&E - Hematoxilina e eosina

GM-CSF - *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

GP1 - glicosilfosfatidilinositol

GR1 – Marcador para neutrófilos, Ly-6G/Ly-6C

IB - *Imonublot*

ID - Imunodifusão dupla

IDO - *indoleamine 2,3-dioxygenase*

IF - Índice de fagocitose

IFI - Imunofluorescência indireta

IFN-γ – Interferon-γ

IFN-α - Interferon-α

IFN-β - Interferon-β

IgA - Imunoglobolina A

IgE - Imunoglobolina E

IgG - Imunoglobolina G

IgG1 - Imunoglobolina G isótipo 1

IgG2a - Imunoglobolina G isótipo 2a

IgG2b - Imunoglobolina G isótipo 2b

IgM- Imunoglobolina M

IKK - *IκB kinase*

IL-1 - Interleucina 1

IL-1β - Interleucina 1β

IL-1R - Receptor para IL-1

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

IL-23 - Interleucina 23

iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida

IRAK - *IL-1 receptor-associated kinase*

IRF - *Interferon regulatory factor*

JNK - *c-Jun N-terminal kinase*

LPS - Lipopolissacarídeo

MAL - *MyD88-adaptor-like protein*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1*

M-CSF - *Macrophage colony-stimulating factor*

MHC - *Major histocompatibility complex*

MIP-1α - *Macrophage inflammatory protein 1 alpha*

MIP-2 - *Macrophage inflammatory protein 2*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

NF-kB - *Nuclear factor-kappa B*

NK - *Natural Killer*

NO - *Nitric oxide*

NOD - *Nod-like receptors*

NOS - *Nitric oxide synthase 2*

OPD - Ortofenilenodiamina

PAMP - *Pathogen-associated molecular patters*

Pb - *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb18 - *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 18

P. brasiliensis - *Paracoccidioides brasiliensis*

PHI - *Phitohemaglutinina*

P. Lutzii - *Paracoccidioides lutzii*

PBS - Solução salina em tampão fosfato

PCM - Paracoccidioidomicose

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PE - *Phycoerythrin*

PerCP - *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*

PI - Iodeto de propídio

PGN - Peptídioglicano

PMN – Polimorfonucleares

PRR - *Pattern recognition receptor*

RT-PCR - *Real Time of Polymerase Chain Reaction*

SFB - Soro fetal bovino

SPF - *Specific pathogen free*

SSc - *side scatter*, Granulosidade celular relativa

RNA - Ácido ribonucléico

TA - Temperatura ambiente

TAK - *Transforming growth factor beta-activated kinase*

T CD4$^+$ - Linfócito T auxiliary

T CD8$^+$ - Linfótico T citotóxico

TIR - *Toll/interleukin-1 receptor-like domain*

TIRAP - *TIR domain containing adaptor protein*

TGF-β - Transforming growth factor β

Th1 - Linfócitos T *helper* classe 1

Th2 - Linfócitos T "helper" classe 2

Th17 - Linfócitos T *helper* classe 17

TLR - *Toll-like receptor*

TLR2 - *Toll-like receptor 2*

TLR3 - *Toll-like receptor 3*

TLR4 - *Toll-like receptor 4*

TLR5 - *Toll-like receptor 5*

TLR7 - *Toll-like receptor 7*

TLR9 - *Toll-like receptor 9*

TNF-α – *Tumor necrosis factor α*

TRAF - *TNF Receptor Associated Factor*

Treg - Célula T reguladoras

TRAM - *TRIF-related adaptor molecule*

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

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

WT - *Wild Type*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose e seus agentes etiológicos.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose de natureza granulomatosa que exibe uma variedade de manifestações clínicas, determinadas pela integridade do sistema imunológico, sexo, idade do paciente, sítio da infecção, bem como da duração da mesma (LONDERO et al., 1990 e RESTREPO et al., 2009). A doença compromete primariamente o tecido pulmonar, podendo atingir o sistema linfático, o tecido mucocutâneo e, por contiguidade, qualquer outro órgão (FRANCO et al., 1987).

A PCM foi descrita inicialmente em 1908, na cidade de São Paulo no Brasil, por Adolf Lutz (1855-1940), o qual publicou suas observações na revista "Brasil Médico", afirmando ter obtido o cultivo do parasita a partir de lesões presentes 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, caracterizando melhor as células fúngicas e sugerindo, em 1912, o nome *Zymonema brasiliensis* ao agente etiológico da PCM (LACAZ, 1994). A doença passou então a ser denominada "blastomicose brasileira" e logo após, "blastomicose sul-americana", devido aos casos observados em outros países da América do Sul. Outras sinonímias foram criadas como "granulomatose blastomicóide neotropical," "granuloma paracoccidióidico", "adenomicose", "doença de Lutz" (LACAZ et al., 1991). Em 1930, o médico Floriano Paulo de Almeida criou um novo gênero, o *Paracoccidioides*, revalidando a espécie *brasiliensis* criada anteriormente por Splendore, sendo então denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). A partir de 1930, os estudos sobre a PCM se intensificaram, 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 pela microscopia eletrônica – o que possibilitou melhor compreensão de sua biologia celular (LACAZ, 1994). O termo PCM foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin (Colômbia) e persiste até hoje como nomenclatura oficial (VALLE & COSTA, 2001).

O gênero *Paracoccidioides* é pertence à família Ajellomycetaceae, da ordem Onygenales, que compreende também os gêneros *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia parva*, *Emmonsia crescens* e *Lacazia loboi* (TEIXEIRA et al., 2009; UNTEREINER et al., 2004).

Por muito tempo, desde sua descoberta, *P. brasiliensis* foi considerado a única espécie causadora da PCM (ALMEIDA, 1930), no entanto, por meio de estudos filogenéticos, 5 novas espécies foram identificadas, mudando esse panorama. Tais espécies foram separadas em: Complexo de espécies *P. brasiliensis* que compreende 4 espécies - S1/ *P. brasiliensis*, PS2/ *P. americana*, PS3/ *P. restrepiensis* e PS4/ *P. venezuelensis* (MATUTE et al., 2006, MATUTE & MCEWEN, 2016, TEIXEIRA et al., 2014, CARRERO et al., 2008, THEODORO et al., 2012) – e a espécie *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*) (TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013).

As espécies possuem diferenças morfológicas em relação aos conídios e leveduras. A espécie *P. lutzii* apresenta seus conídios mais alongados e suas leveduras maiores em relação ao Complexo *P. brasiliensis* (Figura 1) (TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013; HAHN et al., 2003). A maioria dos estudos, até o momento, utiliza isolados e cepas do Complexo *P. brasiliensis*, entre elas a cepa virulenta Pb18, que é amplamente conhecida.

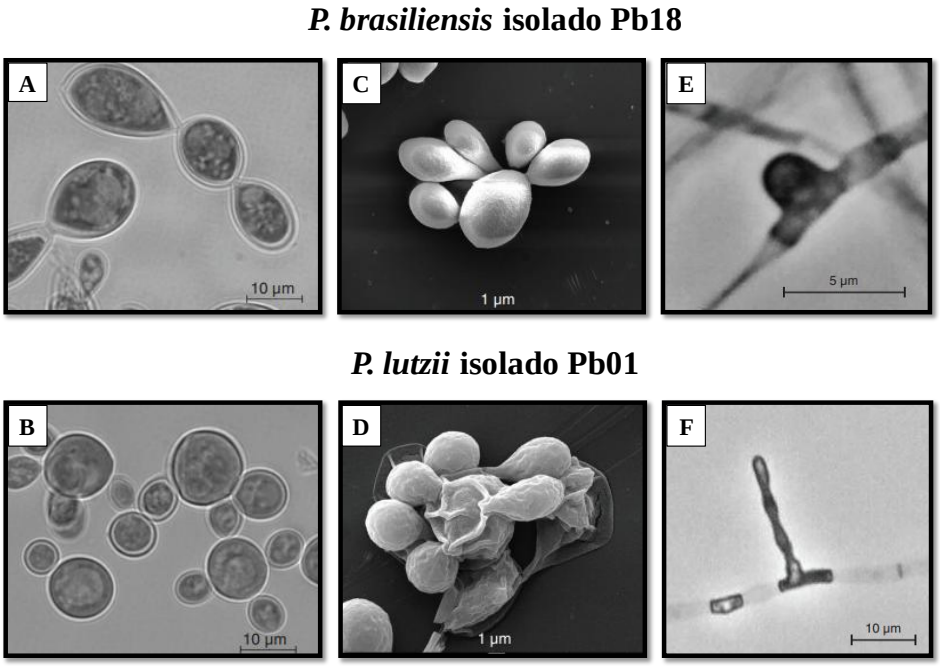

Figura 1. Diferenças morfológicas de conídios e leveduras entre isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e *P. lutzii* Pb01. Diferenças de tamanho celular de leveduras e brotamento são mostradas em A e B por micrografia de luz e em C e D por microscopia de eletronica por varredura. E e F diferença da estrutira do conídio exibida por micrografia de luz . Modificado de Bocca, et al., 2013.

O *Paracoccidioides* spp são patógenos fúngicos que possuem dimorfismo térmico. Quando cultivado ou encontrado em meio ambiente (forma infectante), sob temperatura de 25 °C - 27 °C, tem crescimento micelial apresentando colônias de aspecto cotonoso, de

crescimento lento e, microscopicamente, apresenta hifas hialinas delgadas, finas e septadas, podendo ter esporos terminais ou intercalares. Quando cultivado a 35 °C -37 °C ou encontrado parasitando o homem, o fungo apresenta-se em forma de levedura. Em cultura, sua colônia cresce com aspecto cerebriforme, e ao exame microscópico pode apresentar leveduras com formas arredondadas ou ovaladas, de dupla parede refringente, multibrotantes, com aspecto morfológico característico de roda de leme e com diâmetro variável de 5-30 μm (LACAZ et al., 1991; RESTREPO, 1985; CONTI-DIAZ & RILLA, 1989; BOCCA, et al., 2013).

O habitat e o ciclo de vida do *Paracoccidioides* spp ainda não estão esclarecidos, mas estudos sugerem que esse fungo sobreviva na sua fase miceliana, de forma saprófita, em regiões com vegetação e solos úmidos, ricos em matéria orgânica (RESTREPO et al., 2001).

A associação entre fatores climáticos e diagnósticos clínicos da PCM apontam que o habitat preferencial do *Paracoccidioides* sp seja o solo, com altos índices de precipitação e boa permeabilidade, associado a alta umidade relativa e abundância de vegetais e cursos de água. Períodos chuvosos (aumento do volume de água) e a variabilidade da temperatura entre 18 °C e 28 °C também são favoráveis para a esporulação e dispersão aérea do fungo (BARROZO et al., 2010; BARROZO et al., 2009). O *P. brasiliensis* spp é encontrado vivendo associadamente com animais de sangue quente e frequentemente, é isolado de tatus presentes em regiões endêmicas de PCM (BAGAGLI et al., 2003; CORREDOR et al., 1999). Os tatus estão constantemente em contato com o solo, cavando e vivendo em tocas subterrâneas, podendo contribuir com a disseminação do fungo no solo. Esses animais têm condições imunológicas (baixa imunidade celular) e físicas (temperatura ideal) para serem considerados hospedeiros atrativos (THEODORO et al., 2005; BAGAGLI et al., 2006). Contudo o *P. brasiliensis* ssp também foi isolado de cachorros (FARIAS et al., 2011), 2 bichos preguiça (TREJO-CHAVEZ et al., 2011), pinguins e fezes de morcegos (GEZUELE, 1989; GROSE & TAMSIT, 1965).

1.2. Distribuição geográfica.

A distribuição geográfica da PCM é restrita para América do Sul e Central (desde o México até a Argentina) com maior prevalência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (Figura 2) (RESTREPO et al, 2001; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Porém importantes casos foram registrados nos EUA, Europa e Ásia (BUITRAGO et al., 2011).

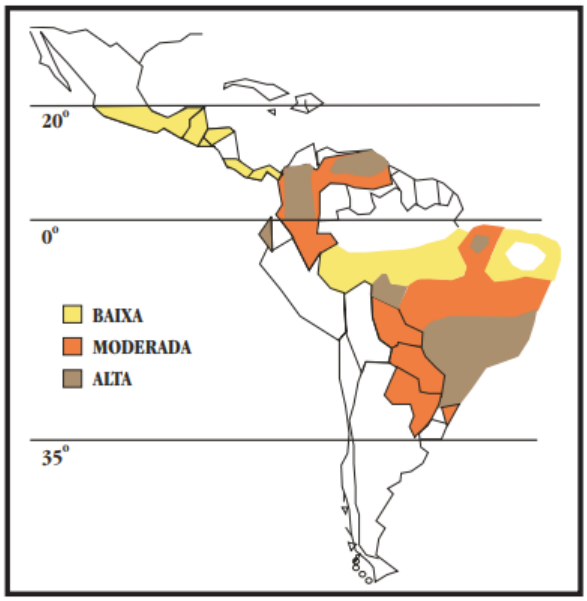

Figura 2 Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose SHIKANAI-YASUDA et al., 2006.

A PCM causa significante impacto socioeconômico nos países latino-americanos, pois afeta trabalhadores rurais no período produtivo da vida (DEL NEGRO et al., 2000). Indivíduos que exercem atividades agrícolas constituem a maior parte dos pacientes com a micose ativa, no entanto, a infecção, que era praticamente rural, vem atingindo zonas urbanas e sendo observada mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros (LACAZ, 1991). Já no Uruguai a micose é reconhecida como uma doença tipicamente ocupacional, ocorrendo apenas em madeireiros (CONTI-DIAZ et al., 1989).

A PCM é a oitava maior causadora de mortalidade no Brasil considerando as doenças infecciosas e parasitárias crônicas, causando cerca de 1,65 mortes por 10^6 habitantes. A incidência da PCM não é totalmente conhecida, mas nas áreas endêmicas, estima-se que anualmente os índices aumentem cerca de 1 a 3 novos casos por 10^5 habitantes, com uma taxa de letalidade entre 2 e 23%, alcançando 30% se associada a AIDS (SANTOS 2008; FELIPE et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARQUES et al., 1983; BARROZO et al., 2009). No território brasileiro, os maiores números de casos descritos estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro – Oeste (WANKE et al., 1994), nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Rio de Janeiro (FRANCO et al., 1989; ALMEIDA et al., 2003). Casos relatados fora das áreas endêmicas são denominados como “doença de importação”, devido ao fato dos pacientes terem residido nestas áreas em época anterior à manifestação da doença, já que a mesma pode possuir período de latência de 4 a 60 anos (em média 14 anos) (RESTREPO, 1985). No Paraná, onde é diagnosticada em quase todo o estado, corresponde à quinta causa de óbitos por doença dessa natureza e é onde está registrada a maior taxa de

mortalidade no país (COUTINHO et al., 2002). Recentemente, entre os anos de 2015 e 2016, 7 novos casos de PCM foram identificados pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, todos oriundos da região da baixada Fluminense no estado do Rio de Janeiro. Os pacientes apresentaram quadros de moderado a grave de saúde, e entre eles houve 1 caso de óbito. O número de casos identificados esta a cima da média dos diagnosticados por ano, que são de 2 a 3 casos. Acredita-se que esses achados podem estar relacionados com a grande remoção de terra decorrente da construção do arco metropolitano do Rio de Janeiro, em que uma quantidade significativa do fungo dispersou-se no ar (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; IBGE, 2016).

A ineficiência de uma notificação compulsória impede que haja dados precisos sobre a gravidade da doença no Brasil. As informações disponíveis baseiam-se em relatos de inquéritos e de séries de casos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; COUTINHO et al., 2002; FAVA & NETTO, 1998; WANKE & LONDERO, 1994). Entre 1985 e 2005, ocorreram 1950 óbitos no estado de São Paulo, onde a PCM foi à causa da morte (SANTO, 2008).

A importância da PCM na saúde pública deve-se aos custos sociais e econômicos decorrentes não apenas da doença em atividade, que afeta indivíduos em fase produtiva, como também das frequentes sequelas secundarias a essa micose, motivo comum de incapacitação para o trabalho (FRANCO et al., 1994).

1.3. Contágio, PCM infecção e PCM doença.

No homem, várias portas de entrada têm sido sugeridas para o *Paracoccidioides* ssp, incluindo pele, mucosas, trato gastrointestinal e pulmões. No entanto, dados experimentais e clínicos suportam a via inalatória como a principal via de entrada (McEWEN, 1987), acometendo preferencialmente e primariamente os pulmões. Após a inalação de pequenos fragmentos de hifas ou conídios, eles são depositados no pulmão e sua morfologia é modificada para forma de levedura, devido à temperatura de 36-37 °C (SAN-BLAS et al., 2002). O fungo na forma de levedura pode ser eliminado por células do sistema imune ou disseminar-se para os tecidos por vias linfáticas e, principalmente, hematogênicas, ocasionando a doença que pode progredir até a morte. Depois de instalado, o *P. brasiliensis* causa lesão benigna e transiente infecção pulmonar ou oral em indivíduos normais. Esta infecção primária é quase sempre subclínica. Se o hospedeiro se torna imune depressivo, uma reativação tardia subsequente resulta em infecção crônica dos pulmões ou outros órgãos,

especialmente o tecido mucoso e cutâneo, os linfonodos, as adrenais e o sistema nervoso central (ALMEIDA, 2005).

No pulmão, o *Paracoccidioides* ssp dá origem a manifestações clínicas de maneira muito insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispneia aos esforços. As lesões da mucosa oral resultam da 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 sialorréia, sangramento, abaulamento dentário e dor. Lesões de palato mole e faringe causam odinofagia que levam ao emagrecimento e à piora do estado geral do paciente. O acometimento da laringe e das cordas vocais ocasiona diversos graus de disfonia, ou mesmo afonia (TELLES, 2005).

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

A PCM manifesta-se, como outras micoses profundas, sob a forma de infecção ou doença.

- **A PCM infecção** caracteriza-se pela ausência de sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (LACAZ et al., 1959). O estabelecimento da doença, bem como a gravidade, depende de fatores inerentes ao fungo e ao hospedeiro.

As manifestações clínicas que caracterizam a PCM-doença apresentam sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais: forma aguda ou subaguda e forma crônica (FRANCO, 1987).

- **A forma aguda ou subaguda (tipo juvenil)** acomete 5% dos casos, é grave, de evolução rápida e é caracterizada pelo envolvimento do sistema mononuclear fagocitico (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) apresentando múltiplas lesões (multifocal) (Figura 3). (GIRALDO et al., 1976). Pode afetar crianças, adolescentes ou adultos (até 35 anos de idade) de ambos os sexos. Os sintomas mais frequentes são febre, perda de peso e anemia moderada. As manifestações clínicas compreendem adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando doenças linfoproliferativas (FRANCO et al.,

1987; RESTREPO-MORENO,1993; BRUMMER et al., 1993). Quando os nódulos linfáticos perihilar são afetados pode acarretar em icterícia obstrutiva. Cerca de 50% dos casos ocorre comprometimento do trato digestivo, lesões na mucosa e na pele (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A resposta imune celular usualmente está deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos. Os achados histopatológicos demonstram a presença de processo inflamatório inespecífico, com granulomas pouco organizados contendo numerosos fungos. (FRANCO, 1986).

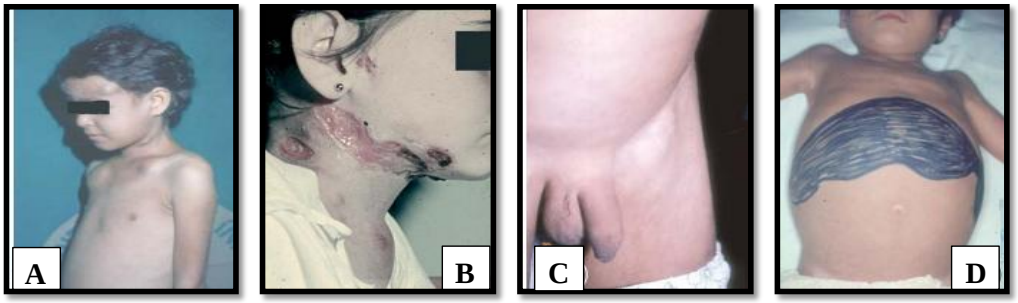

Figura 3. Crianças apresentando a forma aguda da PCM. A- Notar abscessos em regiões frontal e clavicular, resultantes do acometimento osteo-articular. B – Criança do sexo feminino apresentando importante acometimento linfático abscedado. C - Linfoadenomegalia inguinal. D- Acometimento linfático-abdominal com ascite e hepato-esplenomegalia. Consenso em paracoccidioidomicose. Modificado de Shikanai-Yasuda et al. 2006.

- **A forma crônica (tipo adulto)** acomete mais de 90% dos casos e geralmente ocorre em trabalhadores de área rural entre 30 e 60 anos de idade, sendo de instalação lenta e gradual. A gravidade é de baixa a moderada com aparecimento de sequelas em 1/3 dos indivíduos. Geralmente afeta mais o sexo masculino, na proporção de 10-25 homens para 1 mulher. Esta diferença parece estar relacionada com variações no perfil hormonal homem/mulher (LOOSE et al., 1983). Nicol e colaboradores (1965) relataram uma das primeiras observações de que as mulheres seriam menos suscetíveis à PCM que os homens, provavelmente devido a fatores hormonais. Salazar e colaboradores (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, ou seja, a forma infectante na forma parasitária. Stover e colaboradores (1986) descreveram a existência de uma proteína do citoplasma do fungo, em ambas as fases de desenvolvimento, que se liga ao estrogênio, podendo ser considerada um provável receptor desse hormônio. Restrepo e colaboradores (1984) mostraram que o hormônio feminino β-estradiol inibe a transição de micélio para levedura *in vitro*, sugerindo um papel protetor desse hormônio. Aristizabal e colaboradores (1998 e 2002) infectaram camundongos machos e fêmeas com *P. brasiliensis* e mostraram que ambos camundongos quando tratados com β-estradiol a transição de micélio para

levedura não ocorria. Estes resultados reforçam o papel do estradiol na resistência das fêmeas a infecção.

Independente do sexo, a maioria dos pacientes apresentam lesões permanecem localizadas (forma unifocal) ou envolvem mais de um órgão ou sistema (forma multifocal). O pulmão é o órgão mais afetado, cerca de 80% dos casos, seguido de lesões na pele (45,7%) e nas mucosas (oral, da laringe, traqueia) (MOREJÓN et al., 2009). O aparecimento de febre não é frequente, porém pode estar relacionada a uma infecção pulmonar secundária ou associada ao *Mycobacterium tuberculosis*. Outros sintomas que podem estar relacionados são dispneia, perda de peso, fraqueza e expectoração purulenta. Por ser uma doença crônica, a dispneia pode estar relacionada a múltiplos achados radiológicos pulmonar, como infiltrados alveolares, infiltrados intersticial reticulo nodular (PAGLIARI et al., 2011). A insuficiência adrenal foi encontrada em 33-40% dos casos, porém apenas 3-10% foram sintomáticas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; DEL NEGRO et al., 1980). O envolvimento do sistema nervoso central foi encontrado em 6-25% dos pacientes, afetando o córtex, cérebro, cerebelo ou todas as regiões, causando epilepsia, lesões expansivas e sinais cerebelar (Figura 4) (REIS et al., 2013).

Figura 4. Jovens com a forma crônica (tipo adulto) da PCM. A - Massas ganglionares em região supraclavicular, cervical e submandibular. B - A linfoadenomegalia da paracoccidioidomicose deve ser diferenciada de doenças hematológicas, como linfoma. C – Lesões ulceradas em face e pavilhão auricular, de aspecto verruciforme resultante de disseminação hematogênica. D - Lesões de aspecto pápulo-nodular e ulceradas, todas resultantes de disseminação hematogênica. Consenso em paracoccidioidomicose. Modificado de Shikanai-Yasuda et al. 2006.

Histopatologicamente, a doença segue um padrão que é comum às micoses profundas, tendo início por um fluxo de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) em reposta 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 microabscessos bem delimitados. Em sequência, se os neutrófilos falham em destruir as células fúngicas, fagócitos mononucleares (macrófagos) chegam até a aérea 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

que se caracteriza como “células epitelóides”. A presença de macrófagos, células epitelóides linfócitos e fibroblastos, atraídos para a região de agressão e ativados por mediadores específicos, caracteriza a formação de granulomas (KAMINAGAKURA et al., 2007; BRITO e FRANCO, 1994; MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Essa resposta é geralmente eficaz na contenção da infecção, conforme observado pelo contraste entre a frequência de positividade para paracoccidioidina e o número de doentes. Os granulomas, na maioria das vezes, são bem formados e densos nos pacientes com formas menos agressivas da doença (KAMINAGAKURA et al., 2007; CALICH & KASHINO, 1998). O macrófago é a principal célula integrante do granuloma apresentando atividades microbicidas e de apresentação de antígeno, além de juntamente com os linfócitos T, produzirem citocinas. 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 disseminação para outros órgãos e tecidos.

De maneira geral, a imunidade celular tem um papel muito importante na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *P. brasiliensis*, enquanto em pacientes com a forma mais grave da PCM estão associados a títulos altos de anticorpos e ativação policlonal de linfócitos B (CASTANEDA et al., 1988; FAZIOLI, 1997; BERNARD & FRANCO, 2001). Tais características sugerem que a forma mais grave da PCM esta relacionada com uma resposta imune governada por linfócitos T *helper* 2 (Th2) e a patologia mais branda com ativação da imunidade celular comandada pelos linfócitos T *helper* 1 (Th1).

Diversos estudos demonstram claramente que paciente com a forma progressiva e grave da PCM produzem altos títulos de IgE, IgG4 e IgA e secretam níveis altos de citocinas características de resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) (MAMONI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002). Em pacientes com a forma ativa da doença foi encontrado diminuição de IFN-g e aumento da expressão de CTLA-4 em células mononucleares do sangue periférico, este aumento pode estar relacionado com a anergia dos linfócitos T (CAMPANELLI et al., 2003; KARHAWI et al., 1999).

1.4. Diagnóstico.

O diagnóstico da PCM é realizado por meio de métodos diretos (identificação de elementos fúngicos sugestivos de *P. brasiliensis*) e indiretos (diagnóstico sorológico). O método direto é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da PCM, o qual incluem exames a fresco de espécimes biológicos do paciente (pus, escarro, biópsia ou aspirado de

linfonodo) e exames histopatológicos de órgãos supostamente acometidos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SILVA et al., 2004).

Os testes indiretos são de grande importância no diagnóstico e prognóstico da PCM-doença, permitindo ao médico avaliar e acompanhar a progressão da doença bem como a resposta do paciente frente ao tratamento recomendado. Os testes sorológicos disponíveis no país compreendem os métodos de imunodifusão dupla (ID), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB). Quando utilizado antígenos adequados e técnicas padronizadas estes testes apresentam sensibilidade entre 85-100%. O título de anticorpos contra o *P. brasiliensis* tem relação direta com a gravidade das formas clínicas. Títulos mais elevados estão relacionados com a forma aguda e subaguda da doença. Resultados falso-negativos (FN) podem ser observados em pacientes com lesões localizadas e em pacientes imunodeprimidos, como em pacientes HIV positivos. Casos de resultados falso-positivos (FP) podem ser observados em pacientes com histoplasmose ou aspergilose, pois geneticamente esses fungos são muito próximos do *P. brasiliensis* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; CAMARGO et al., 2008).

Hoje o método de ID em ágar é visto como principal teste sorológico para PCM, devido sua simplicidade de execução, baixo custo e sensibilidade e especificidade dentro do aceitável (>80% e 90%, respectivamente). Independente do teste a ser utilizado é recomendado que se faça titulação do soro dos pacientes para melhor interpretação da resposta terapêutica, devido os títulos de anticorpos apresentarem diminuição progressiva com o controle da doença. Para o critério de cura sorológica no seguimento do tratamento, é indicado que ocorra negativação ou estabilização do teste em títulos 1:2 ou menores, no entanto alguns pacientes podem apresentar títulos abaixo de 1:4 no diagnóstico da doença, o que limita muito o uso do critério de cura sorológica (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

1.5. Tratamento.

O tratamento da doença é normalmente prolongado, podendo durar até cindo anos. Atualmente é feito à base de sulfas e/ou drogas antifúngicas, seguidas de acompanhamento pós-terapêutico. As drogas frequentemente utilizadas são itraconazol, cetoconazol, sulfametoxazol, trimetroprim e anfoterecina B, que apresentam eficiência significativa, mas com severos efeitos colaterais. O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado, como do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. A regressão das alterações clínicas é observada entre um e seis meses após o início do

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

As sulfonamidas são a primeira classe de drogas disponíveis para o tratamento de pacientes com PCM. Apesar do fato de outros derivados de sulfonamidas terem sido usados com sucesso nessa doença, a grande experiência documentada na literatura médica refere-se a sulfadiazina e à combinação de trimetropim e sulfametoxazol. Embora a resposta clínica geral inicial para o tratamento seja satisfatória, longos períodos podem ser necessários (geralmente mais de 2 anos), o que leva a uma preocupação crescente quanto a toxicidade das drogas, os custos de tratamento e altas taxas de abandono do tratamento. A maioria dos centros médicos sugerem que a combinação trimetropima e sulfametoxazol deve ser utilizada como primeira escolha terapêutica devido à sua eficácia clínica, baixo custo, segurança e boa penetração no sistema nervoso central. O tratamento antifúngico geralmente dura anos, até que haja uma resposta clínica e resolução completa ou calcificação das lesões parenquimatosas documentadas por imagens radiológicas (ELLIAS et al., 2005; ALMEIDA et al., 2005).

A introdução de azóis para a prática clínica representou um avanço importante em micologia médica. Miconazol, os primeiros derivados azólicos, disponíveis para administração parenteral, eram usados para tratar pacientes com PCM e apresentaram bons resultados clínicos. No entanto, este fármaco foi posteriormente excluído devido ao seu espectro antifúngico limitado, perfil inseguro e falta de formulação oral (ALMEIDA et al., 2005, MAERTENS, 200). Cetoconazol mostrou ser uma alternativa no tratamento de pacientes com PCM, mas podem ocorrer recidivas. (MAERTENS, 2004; DEL NEGRO et al., 1982).

A anfotericina B foi utilizada pela primeira vez no tratamento da PCM em 1958, com grande sensibilidade do fungo. Apesar de sua eficácia comprovada, é uma droga tóxica que requer longo período de hospitalização para sua administração (CAMPOS et al., 1984). Essa droga é muito eficaz contra o *P. brasiliensis*, mas a longo prazo ainda é necessária terapia supressiva com derivados de sulfa para evitar recaídas. Levando em consideração toda a toxicidade relacionada ao tratamento com anfotericina B, a sua indicação terapêutica foi limitada a pacientes com deteriorações clínicas graves ou refratários ao tratamento com sulfa e derivados de azóis (DILLON et al., 1986; NEGRONI et al., 1977).

A descoberta das equinocandinas foi de grande importância para o arsenal de antifúngicos (HOLT & DREW, 2011). O grupo das equinocandinas é dividida em 3 drogas: anidulafungina, caspofungina e micafungina, que são inibidores seletivos da síntese de β-(1,3)-D-glucana, componente essencial da parede celular do fungo, levando a instabilidade osmótica e morte da célula (EUROPEAN et al., 2011; EMA, 2011; EMA, 2009). Este grupo tem como vantagem sua baixa toxicidade. É considerado como a primeira linha de tratamento em crianças e adultos neutropenicos e não neutropenicos com candidemia ou com suspeita de candidíase invasiva, exibindo rápida atividade fungicida (PAPPAS, et al., 2004; ULLMANN, et al., 2012) . Além de desempenhar boa atividade fugistática contra espécies de *Aspergillus* (SUCHER et al., 2009; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003).

1.6. Resposta imunológica e vias de sinalização.

Na PCM como em outras infecções granulomatosas crônicas, a resposta imune celular representa o principal mecanismo de defesa. Tem sido sugerido que a gravidade da PCM esta relacionada diretamente com a produção de anticorpos mediadas por uma resposta Th2, enquanto formas mais brandas da doença com uma resposta Th1 (MAMONI et al., 2002; KARHAWI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002).

Calich e colaboradores (1985) estabeleceram linhagens isogênicas de camundongos com diferenças entre resistência e susceptibilidade a infecção por *P. brasiliensis*. Assim, foi caracterizado como resistente as linhagens A/Sn e A/J, e como susceptível a linhagem B10.A. Cano e colaboradores (1995) demonstraram que os camundongos A/Sn desenvolveram PCM crônica, benigna e restrita aos pulmões, enquanto que os animais B10.A desenvolveram doença disseminada e progressiva. Estudo sobre o papel de IFN-γ na resistência à infecção exibiu que tal citocina tem um papel protetor na PCM pulmonar e que ao depletarem IFN-γ, tanto em animais resistentes quanto em susceptíveis, a doença se agravou (CANO et al., 1998).

No entanto, alguns estudos apontam observações de que o padrão Th1/Th2 de resposta não explica completamente os fenômenos de resistência e susceptibilidade a PCM. Foi observado que a citocina IL-4 é protetora para camundongos susceptíveis, enquanto o tratamento com IL-12 exógena diminui a disseminação do fungo, mas induz intensa patologia pulmonar associada a um influxo de células inflamatórias (ARRUDA et al., 2002; ARRUDA et al., 2004). A população de linfócitos T $CD4^+$ em camundongos susceptíveis é completamente anérgica e a depleção dessas células não altera o curso da doença

(CHIARELLA et al., 2007). Já em camundongos resistentes, os linfócitos T $CD4^+$ produtores de IFN-γ são ativados no início da resposta imune e mais tardiamente ativam subpopulações Th2. Tal ativação parece contribuir para o padrão resistente regulando negativamente o processo inflamatório lesivo nos tecidos (CAMPANELLI et al., 2003).

Interessantemente, experimentos com camundongos deficientes das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ exibiram que os linfócitos T $CD8^+$ são fundamentais para o controle da PCM e podem se apresentar sob os padrões do tipo 1 (secretor de IFN-γ) ou tipo 2 (secretor de IL-4) (CALICH & BLOTTA, 2005; CHIARELLA et al., 2007;ARRUDA et al., 2007).

A defesa imunológica do hospedeiro contra micoses sistêmicas é complexa e multifatorial. Os elementos inatos constitutivos participam na interação com o fungo, como por exemplo, as barreiras da pele, células epiteliais que compõe a mucosa, o trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário (ROMANI et al, 2004). As defensinas, proteínas do sistema complemento, anticorpos naturais e células fagocíticas também fornecem mecanismos de defesa constitutiva, opsonização e reconhecimento do fungo (HUFFNAGLE & DEEP, 2003).

A resposta imune inata utiliza seus mecanismos de forma rápida e conservada em resposta a uma ampla variedade de patógenos fúngicos. Como alternativa, o sistema imune inato desenvolveu receptores denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs melhor caracterizados compreendem 5 famílias: 1ª) Receptores do tipo *Toll* (TLRs) - que incluem de TLR1 à TLR12. 2ª) Receptores de lectina tipo-C (CLRs) - que incluem Dectina 1 (também conhecida por CLEC7A), Dectina 2 (também conhecida por CLEC6A), DC-SIGN, mincle (MRC) e os receptores de manose (MR). 3ª) Receptores do tipo NOD (NLRs). 4ª) Proteínas da família das galectina – que inclue Galectina 3. 5ª) Receptores tipo RIG-1 (RLR) (YONEYAMA et al., 2004; JOUAULT, 2009; BOURGEOIS et al., 2010; VAN DER VEERDONK et al, 2008). Tais PRRs têm como alvo estruturas moleculares comuns a grandes grupos de patógenos, mas que não são encontradas no hospedeiro, estas estruturas são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A parede celular dos fungos é a principal fonte de PAMPs que serão reconhecidos pelos PRRs presentes nas células dos hospedeiros. A parede apresenta variedades em sua composição, as quais podem estar envolvidas com o tipo morfológico, estágios de crescimento e o ambiente particular de cada espécie de fúngica (PERRUCCIO et al., 2005). Entre os fungos patogênicos de relevância clínica, os principais componentes de parede celular são as β-glucanas (polímeros de glucose) sendo a principal delas a β-(1,3)-glucana, a quitina (polissacarídeo constituído por

um polímero de N-acetilglicosamina), a manana (cadeias de grande quantidade de moléculas de manose que são inseridas nas proteínas fúngicas via *N*- ou *O-linkages*); e a β-(1,2) monosídeo (seu reconhecimento pela Galectina 3, permite que os fagócitos diferenciem leveduras patogênicas das não patogênicas) (ROMANI, 2011).

Durante o período de uma infecção fúngica, diversos PRRs do hospedeiro são estimulados por diferentes combinações de PAMPs do fungo, sendo essas combinações particulares de cada espécie fúngica. Portanto, o tipo de resposta imune que será induzida dependerá de um conjunto de fatores, como o estímulo individual dos receptores em resposta a determinadas espécies de fungo, em combinação com a localização celular (ROMANI, 2011).

Os PRRs expressos nas células fagocíticas, como neutrófilos, monócitos e principalmente em macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002), ativam sinalizações intracelulares, promovendo respostas imunes específicas e *clearence* do fungo, dependendo do tipo de célula envolvida (BOURGEOIS et al., 2010). No entanto, alguns fungos podem utilizar os PRRs para evadir e burlar as respostas do hospedeiro para sua própria sobrevivência e replicação. Neste contexto, a ativação dos PRRs pode ser responsável por promover algumas infecções e danos nos tecidos (ROMANI, 2011).

A participação dos TLRs na defesa do hospedeiro já foi descrita para diversos patógenos fúngicos, tais como *Candida albicans* (*C. albicans*) (NETEA et al., 2006; NETEA et al., 2002), *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) (DUBOURDEAU et al., 2006; MEIER et al., 2003) e *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) (BIONDO et al., 2005; YAUCH et al., 2004). Esses receptores atuam como um botão molecular para disparar a ativação da imunidade inata e regular uma subsequente resposta imune adaptativa, essenciais no controle das infecções. Neste contexto, os TLRs induzem a maturação de células dendríticas, as quais irão ativar a segunda linha de defesa, a resposta adaptativa (KAWAI e AKIRA, 2011).

O envolvimento dos TLRs na imunidade inata foi inicialmente descrito em *Drosophila melanogaster* e, posteriormente, foram identificados homólogos em humanos (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Os TLRs são moléculas transmembrânicas que contêm um domínio extracelular com sequências ricas em leucina (LRR), particulares para cada TLR, existe uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a IL-1 (IL-1R), chamada domínio Toll/IL-1R (TIR) (GAY & KEITH, 1991). A família dos TLRs compreende, até o momento, doze proteínas identificadas em camundongos e 10 em humanos (AKIRA et al., 2006) dos quais TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 estão

presentes na membrana plasmática e reconhecem componentes moleculares localizados na superfície dos patógenos. Já, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados intracelularmente e reconhecem ácido nucleicos (LEE et al., 2012). Entre seus diversos ligantes, os mais caracterizados são peptidoglicanos (PGN) (ligantes de TLR2), lipoproteínas bacterianas (ligantes de TLR1, TLR2 e TLR6); flagelina, componente do flagelo microbiano (ligante de TLR5); sequências de DNA não metilados, ricas em CpG, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9); RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3); LPS presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante de TLR4), RNA de fita simples (ligantes de TLR7 e TLR8), entre outros (AKIRA et al., 2006).

O reconhecimento dos TLRs, por seus ligantes, induz o recrutamento de proteínas adaptadoras, que irão se acoplar e promover um complexo denominado Complexo *Myddosome*, para ativação de NFκB - dependente de proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e/ou Complexo *Triffosome*, para a ativação de IFN e fatores regulatórios (IRFs) pelo adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon β (TRIF) (GAY et al., 2014). Myd88 e/ou TRIF irão transduzir uma cascata de sinalização que culminará na ativação de quinases e fatores de transcrição, como o NF-kB, que levam a secreção de citocinas pró inflamatórias, IFN do tipo I, quimiocinas e peptideos antimicrobianos. Toda essa resposta causa recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos, resultando na eliminação do patógeno (KAWAI & AKIRA, 2010).

A ativação dos TLRs dependentes da molécula MyD88 (molécula compartilhada por quase todos os TLRs exceto TLR3) é iniciada associadamente com a IRAK4. Isto favorece a fosforilação de IRAK1, a qual é autofosforilada em diversos sítios e liberada do MyD88 (JIANG et al., 2002). IRAK1 juntamente com IRAK2 permite a ligação da molécula TRAF6 ao complexo (GAY et al., 2011). TRAF6 com UBC13 e UEV1A, enzimas conjugadoras de ubiquitina, promovem poliubiquitinação da própria TRAF6 e TAK1, um membro da família MAPKKK, e formam um complexo com subunidades TAB1-3, a qual interage com TRAF6 levando a ativação de TAK1 (CHEN, 2010; AJIBADE, 2012). TAK1 ativada induz a ativação do complexo IKK, o qual leva a ativação de NF-kB (CONZE et al., 2008; VERSTREPEN et al., 2008). Simultaneamente, TAK1 ativa dois membros da família MAPK que subsequentemente ativam JUN N-terminal kinase (JNK) e p38, induzindo a produção de citocinas inflamatórias. No caso dos receptores TLR7, TLR8 e TLR9 a via MyD88-IRAK4 também leva, pela ativação de TRAF3 e TRAF6, à sinalização via IRF7, que por sua vez,

regula a produção de IFN do tipo 1. Os TLR2 e TLR4 necessitam, além da molécula MyD88, também da molécula adaptadora TIRAP (Figura 5).

O reconhecimento dsRNA pelo TLR3 gera a dimerização e fosforilação de TLR3, a qual então recruta a proteína adaptadora TRIF (YAMASHITA et al., 2012). No entanto, estudo recentes descobriram a proteina WDFY1 que serve como ponte na interação de TLR3 com TRIF (HU et al., 2015). TRIF contém vários domínios conservados que são responsáveis pela associação com RIP1, TRAF6 e TBK1. RIP1 e TRAF6 participam na ativação de NF-κB mediada por TRIF, enquanto TBK1 fosforila, diretamente, o fator de transcrição IRF3, o qual sofrerá dimerização e translocação para o núcleo (MEYLAN et al., 2004; LEE et al., 2012; FITZGERALD et al., 2003). A ativação de NF-κB e IRFs induzem a produção de diversas citocinas pró inflamatórias e IFNs (Figura 5). Já foi estabelecido que a ativação de NF-kB, após infecção por microrganismo, resulta na indução de um amplo repertório de genes, muitos dos quais contribuem para o estabelecimento da resposta inflamatória, como TNF-α, IL-1 e IL-6 (LEI et al., 2010; ZHONG et al., 2008; DOYLE e O'NELL, 2006).

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

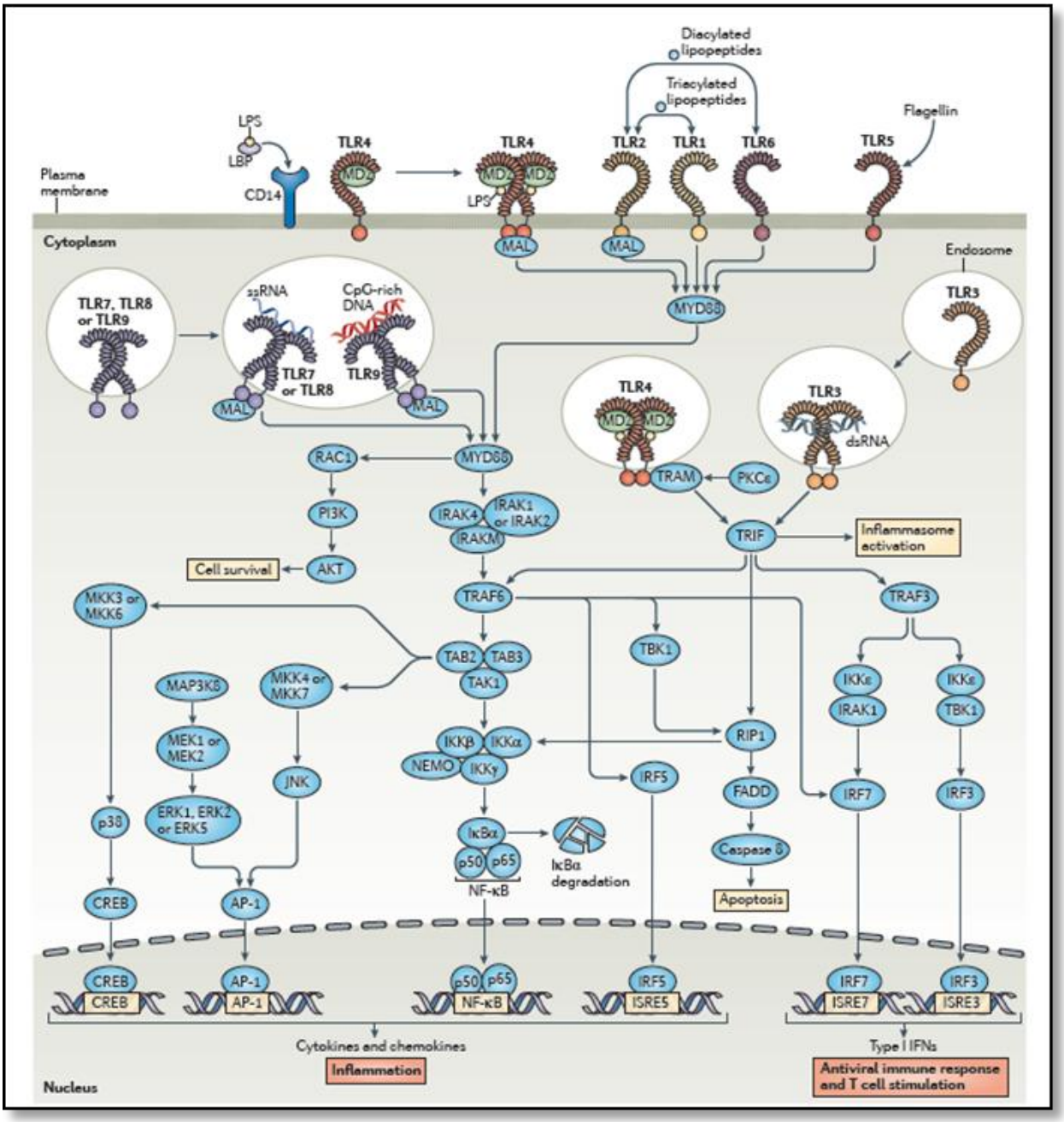

Figura 5 Representação esquemática da sinalização mediada por TLRs e as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF . Modificado de Gay, et al., 2014.

Cada vez mais vem sendo demonstrada a importância dos TLRs no reconhecimento de diversos patógenos. Este reconhecimento muitas vezes determina o curso da doença causada por bactérias, fungos, protozoários e vírus. (NETEA et al., 2006; ROPERT et al., 2008; THOMPSOM et al., 2008). Em trabalho pioneiro, Campos e colaboradores sugerem que grupamentos glicosilfosfatidilinositol (GPI) isolado do protozoário *Trypanosoma cruzi* ativam a produção de IL-12, TNF-α e óxido nítrico (NO) por macrófagos de camundongos via TLR2. Assim, a ativação de TLR2 poderia iniciar um mecanismo de defesa inata e uma resposta inflamatória durante o processo de infecção pelo protozoário. O mesmo grupo, em 2004,

relatou que LPS, derivado da bactéria *Brucella abortus*, ativa macrófagos via TLR4. Este fato foi demonstrado utilizando camundongos que tem uma mutação no gene que codifica TLR4 (C3H/HeJ) e uma linhagem normal (C3H/HePas) que expressa o receptor inalterado. Macrófagos de ambas as linhagens foram desafiados com LPS, porém os deficientes para TLR4 produziram níveis menores de IL-12 e TNF, o que sugere a participação de TLR4 na imunomodulação dos macrófagos.

Em infecções fúngicas, TLR2, TLR4 e TLR9 são os principais receptores envolvidos no reconhecimento de componentes como zymosan, fosfolipomanana, O-ligado a manana e DNAs (VAN DE VEERDONK et al., 2008). A contribuição individual dos TLRs pode variar dependendo da espécie fúngica, tipo morfológico, rota de infecção e receptor envolvido.

Na PCM, foi demonstrado que a ativação de TLR2 tem efeito benéfico na infecção pulmonar, com maior produção de IL-10, inibição do perfil de resposta Th17 e promoção da expansão de células T reguladoras (Treg), contendo a reação inflamatória exacerbada e, consequentemente, reduzindo a patologia pulmonar (LOURES et al., 2009). Em ensaios *in vitro*, com macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 e TLR2$^{-/-}$, foi evidenciado que o TLR2 é fundamental no reconhecimento e fagocitose de leveduras do *P. brasiliensis*, e que este receptor também contribui para a produção de NO pelos macrófagos (CALICH et al., 2008). Outro grupo evidenciou que camundongos deficientes de galactina 3 e infectados com *P. brasiliensis* apresentavam aumento nos transcritos para TLR2 e aumento nos níveis de IL-10 em macrófagos (RUAS et al., 2009). Nosso grupo mostrou que células dendríticas (DCs) pulmonares de camundongos B10.A (modelo suscetível à infecção por *P.brasiliensis*) aumentam a expressão de TLR2, ao contrário das DCs dos animais A/J (modelo de resistência). A expressão de TLR2 foi relacionada com a produção de grandes quantidades de IL-10, que contribuiu para a susceptibilidade dos animais na infecção (FERREIRA et al., 2007). Em outro trabalho, foi observado que a administração terapêutica de lectinas KM^{+} provenientes de *Artocarpus integrigólia* (jaca), em camundongos BALB/c, é protetora durante a infecção pelo *P. brasiliensis* através da produção de IL-12 via TLR2 (COLTRI et al., 2008).

Além de TLR2, a ativação de TLR4, em ensaio *in vivo*, foi correlacionada ao aumento da carga fúngica e a diminuição da expansão de células Treg. Essa diminuição culminou no aumento da extensão da lesão inflamatória, exercendo um efeito prejudicial no pulmão dos camundongos. Em contrapartida, a ausência de TLR4 tem efeitos benéficos para o hospedeiro no início da infecção, podendo ser observado diminuição da carga fúngica. Contudo, durante o curso da doença a ausência deste receptor resulta na ineficiente imunidade mediada por

células T, com diminuição de citocinas de resposta Th1 e Th17, e é fortemente controlada por células Treg, resultando no aumento da carga fúngica. Em ensaios *in vitro*, macrófagos deficientes de TLR4 apresentaram menor capacidade fagocítica, diminuição da produção de NO e IL-12. Ambos os mecanismos levaram a uma evolução crônica da infecção (LOURES et al., 2010). Acorci-Valério e colaboradores (2010) sugeriram que a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* utiliza TLR4 como acesso em neutrófilos humanos, no entanto, esse acesso não resulta no aumento da capacidade de matar destas células e sim no aumento da produção de IL-18 e IL-10, citocinas envolvidas no escape de Pb18 em neutrófilos humanos. Dessa forma, o grupo aponta a interação de TLR4 com Pb18 como um mecanismo de escape do fungo em neutrófilos humanos.

Sabendo que a molécula adaptadora MyD88 está envolvida na ativação da maioria dos TLRs, inclusive de TLR2 e TLR4, recentemente foi sugerido em ensaios *in vivo*, que a ausência de tal molécula causa profundos efeitos na ativação celular, com menor afluxo de célula T CD4 ativadas no pulmão dos animais resultando na maior carga fúngica pulmonar e disseminação do fungo para baço e fígado. Os animais deficientes de MyD88 infecção mais grave e mortalidade precoce na PCM experimental (LOURES et al., 2011).

Menino e colaboradores (2013) mostraram que a ativação de TLR9 é importante na proteção inicial contra *P. brasiliensis*, impedindo uma resposta inflamatória exacerbada associada a aumento do recrutamento de neutrófilos. Além disso, em estudo *in vitro*, o grupo observou que a ausência de TLR9 diminuiu a capacidade fagocítica de macrófagos e sugeriu que o aumento do recrutamento de neutrófilos, *in vivo*, pode estar associado a maior disponibilidade de leveduras presente no organismo.

Ainda no estudo de receptores TLR intracelulares, diversos estudos têm demonstrado o envolvimento do TLR3 na resposta imunológica contra infecções fúngicas. Esse receptor está associado a membranas de vesículas e desempenha papel importante na modulação da resposta imune inata e de inflamação nas vias aéreas. Embora o reconhecimento de dsRNA e poly (I:C) sejam os estímulos mais conhecidos, o TLR3 também é capaz de reconhecer ligantes endógenos como RNA heterólogo, que está aumentado em células necróticas ou gerado por transcrição *in vitro* (ALEXOPOULOU et al., 2001; KARICÓ et al., 2004; CAVASSANI et al., 2008). A sinalização de TLR3 ocorre por uma via independente de MyD88, ao contrário dos demais TLRs, e utiliza como molécula adaptadora a proteína TRIF, que induz a produção de IFN-α/β (TAKEDA et al., 2003).

O papel de TLR3 tem sido intensivamente estudado na infecção por *A. fumigatus*. Em modelo de aspergilose murino, o TLR3 exerceu o papel de sensor endógeno do RNA do fungo, levando a expressão da enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) em células epiteliais e DCs, contribuindo para a regulação da inflamação local (CHAUDHARY et al., 2010; DE LUCA et al., 2010; BONIFAZI et al., 2010). Carvalho e colaboradores (2012) estudaram o envolvimento de TLR3 na ativação da imunidade mediada por célula T $CD8^+$. Os autores demonstraram que a sinalização desse receptor em DCs, pulsadas com conídios ou RNA de *A. fumigatus*, foi capaz de ativar tais células *in vivo* e *in vitro* levando a uma resposta de memória e protetora. Recente trabalho exibiu a importância de TLR3 na proteção contra a infecção por *A. fumigatus*, em condições de TLR3 deficiente, houve aumento da susceptibilidade da aspergilose tanto em camundongos quanto em humanos, apontando um possível reconhecimento de antígeno dependente de TLR3 na aspergilose. Em 2014, a baixa expressão de TLR3 foi associada ao aumento de susceptibilidade em pacientes com aspergilose pulmonar cavitária crônica (CCPA) (SMITH et al., 2014). Em estudos sobre a atividade imunomodulatória do antifungico micafungina na aspergilose invasiva experimental, demonstrou que sua eficácia terapêutica requer a contribuição da sinalização via TLR2/dectina1 e TLR3/TRIF, que afeta o balanço entre a atividade inflamatória e anti-inflamatória durante a infecção (MORETTI et al., 2013).

Trabalhos envolvendo outras infecções fúngicas também demonstraram um papel importante de TLR3 na patologia da doença. Recentemente, Nahum e colaboradores (2012) demonstraram que a susceptibilidade de pacientes com candidíase crônica está relacionada com uma isoforma não funcional de TLR3 denominada L412F. Outro trabalho, utilizando células epiteliais infectadas com *C. albicans*, demonstrou que TLR3 contribuiu na mediação de resposta próinflamatória que exercem papel funcional na resposta do hospedeiro (MÜLLER et al., 2007). Em estudos de criptococose neural, foi demonstrado que TLR3 não apresenta papel significativo em relação à fagocitose de *C. neoformans* por células microglia (REDLICH et al., 2013).

Sabendo que a sinalização via TLR3 tem se mostrado importante em modelos de infecções fúngicas, e que o seu papel na infecção por *P. brasiliensis* ainda não foi elucidado, esse trabalho visou avaliar a importância desse receptor na Paracoccidioidomicose experimental.

2. OBJETIVO

O principal objetivo desse trabalho é investigar o papel do TLR3 na infecção por *P. brasiliensis*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

***In vivo*:**

Após infecção de animais TLR3$^{-/-}$ e seu respectivo controle C57BL/6

- Avaliar por meio de unidades formadoras de colônias e análise histopatológica do pulmão, o potencial de infecção das leveduras de *P. brasiliensis*; bem como investigar o perfil celular (macrófagos, neutrófilos, DCs e linfócitos) nos pulmões;
- Caracterizar o perfil de resposta imune ativada (Th1/Th2/Th17) por meio de citocinas;
- Investigar o perfil de células T produtoras de IFN-γ e IL-17,
- Investigar a presença de células T regulatórias
- Determinar o perfil de resposta imune humoral através da análise de imunoglobulinas produzidas;
- Avaliar a capacidade linfoproliferativa

In vitro:

Após a diferenciação de BMDMs de animais TLR3$^{-/-}$ e seu respectivo controle C57BL/6

- Avaliar o perfil fagocítico de leveduras de *P. brasiliensis*;
- Caracterizar a expressão de moléculas de superfície (CD80, CD86, CD40, MHC-I e MHC-II);
- Avaliar a capacidade fungicida dos BMDMs por meio de unidades formadoras de colônias e dosagem de NO;
- Investigar a participação dos principais PRRs

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animal

Foram utilizados camundongos, isogênicos, fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas, das linhagens C57Bl/6 (controle) e TLR3 *knockout* ($TLR3^{-/-}$), obtidos do Biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e do Biotério de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, respectivamente. Os animais foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram eutanasiados de acordo com os critérios aprovados pela Comissão de Ética em experimentação animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEUA), Protocolo CEUA/FCF/449.

3.2 Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta Pb18 (KASHINO et al., 1987) de *P. brasiliensis* para as infecções intratraqueais, bem como para ensaios *in vitro*. A cepa foi mantida em meio Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK – Alemanha), em estufa de 37 °C, com repiques quinzenais.

3.3 Antígeno livre da parede do fungo (CFA) da cepa Pb18 de *P. brasiliensis*

O repique da cepa Pb18, com 15 dias de crescimento, foi dissolvido em 10 mL de PBS 1x estéril. A suspensão foi agitada em vortex por 15 minutos, para que a parede do fungo fosse totalmente rompida. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante recolhido para obtenção do antígeno livre da parede do fungo.

3.3.1 Dosagem do CFA

A concentração do CFA foi medida de acordo com o método proposto por Bradford em 1976, em que o *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (Sigma – St. Louis – Estados Unidos) foi utilizado como reativo e o BSA (1,0 mg/mL) como padrão do teste.

3.4 Ensaios *In vivo*

3.4.1 Preparação do inóculo

Leveduras da cepa Pb18 foram coletadas em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), deixando-se decantar as partículas maiores por 3 minutos. A suspensão mais leve, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi coletada com auxílio de seringa de insulina e em seguida a contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer. Posteriormente, $1x10^6$ leveduras em 50 µL foram utilizadas nos ensaios de infecção intratraqueal.

3.4.2 Infecção intratraqueal

O procedimento foi realizado com animais sob efeito de anestésico, seguindo o esquema: Xilazina (pré-anestésico), Cetamina (anestésico) e PBS na proporção de 3:3:4. Quando os animais já estavam insensíveis à dor foi feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, e a traqueia exposta. Os animais foram infectados com uma suspensão contendo $1x10^6$ leveduras da cepa Pb18 contidas em 50 µL de PBS. Após inoculação, a incisão foi suturada e os animais foram colocados sob uma fonte moderada de calor (lâmpada) para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem. Foram utilizados 5 animais por grupo.

3.4.3 Determinação das Unidades formadoras de colônias (UFC)

Camundongos C57Bl/6 e $TLR3^{-/-}$ foram infectados, como descrito anteriormente, e após 30 dias foram eutanasiados para obtenção dos pulmões. Os pulmões foram pesados e macerados em placa de 60x15 (KASVI), sendo 1 animal por placa, com 1 mL de PBS 1x estéril. Em seguida, foi plaqueado 100 µL do macerado, em duplicata, em placas de 90x15 (KASVI) contendo meio BHI (Brain Heart Infusion Agar – OXOID – Inglaterra) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab – Campinas, Brasil). As placas foram incubadas na estufa à 37 °C por 15 dias e após esse período realizamos a contagem das colônias. O número de colônias, referente ao pulmão de cada animal, foi dividido pelo peso do órgão respectivo.

3.4.4 Ensaios enzimáticos

3.4.4.1 Produção de citocinas

Camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$, foram eutanasiados após infecção de 1, 3, 5, 15 e 30 dias. Os pulmões e linfonodos foram retirados e macerados em placas 60x15 (KASVI) com 1 mL de PBS-1x estéril. O macerado foi centrifugado por 5 min à 1800 rpm para desprezar resquícios celulares. A partir do sobrenadante, as citocinas IL-10, IL-12, IL-4, IL-17A, IFN-γ, IL1-β, IL-6 e TNF-α foram dosadas pela técnica de ELISA, de acordo com instruções do fabricante (R&D®). Os valores basais destas citocinas foram analisados através dos grupos de camundongos que receberam somente PBS pela via intratraqueal.

3.4.4.2 Dosagem de imunoglobulina

Após 30 dias de infecção, os animais foram anestesiados e submetidos à punção cárdica para obtenção de sangue. Esse procedimento foi seguido da eutanásia do animal. O sangue coletado foi centrifugado à 15.000 rpm por 20 minutos para obtenção do soro. O mesmo foi e utilizado para dosagem de imunoglobulinas totais e seus subtipos, utilizando a técnica de ELISA.

Para a determinação dos títulos de IgG, IgG1 e IgG2a utilizamos o método de ELISA, descrito pelo grupo (MÚFALO et al., 2008; GENTIL et al., 2010). Foram utilizadas placas de 96 poços (3590, Costar), sensibilizadas com CFA na concentração de 4 µg/mL, diluído em tampão carbonato [(15 mM Na_2CO_3, 34,9 mM $NahCO_3$ (synth); pH=9,6] em um volume final de 50 µl de solução por poço.

As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 12 horas. Posteriormente, realizamos 3 lavagens com PBS-Tween [0,05% Tween 20 (USB Corporation), em PBS, pH=7,4], adicionamos 200 µl/poço de solução bloqueio [5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% (m/v) albumina sérica bovia (BSA-Sigma) em PBS], durante 2 horas a 37 °C. A solução de bloqueio foi desprezada e adicionamos 50 µl/poço das amostras de soro dos camundongos, diluídas a 1:100 (IgG) e 1:25 (IgG1 e IgG2a) em solução bloqueio, seguida pela incubação de 1 hora a temperatura ambiente (TA). Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween. Foram adicionados 50 µl/poço dos respectivos anticorpos secundários conjugados a peroxidase (Goat Anti-mouse IgG, human ads-HRP, Goat Anti-mouse IgG1, human ads-HRP e Goat Anti-mouse IgG2a, human ads-HRP) diluídos 1:300. Outra incubação foi realizada por 1 horas em TA, seguida de 3 lavagens com PBS-Tween. Na etapa de revelação adicionamos 100 µl/poço da solução de revelação [9,25 mM OPD (Sigma);

0,1% (v/v) H_2O_2 (Merck)] em tampão fosfato-citrato [200 mM Na_2HPO_4 (Synth), 218 mM $C_6H_8O_7$ (Synth); pH=4.5-5.0] e icubamos no escuro, em TA, por 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µl/poço de solução (4N de H_2SO_4).

Os títulos foram determinados em uma leitora de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA).

3.4.5 Análise das populações celulares por Citometria de Fluxo

3.4.5.1 Obtenção de células totais do pulmão e linfonodo

Camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram infectados, descrito na sessão **3.4.2**, e eutanasiados após 1, 3, 5, 15 e 30 dias, conforme a investigação a ser avaliada. Após cada tempo, pulmões e linfonodos foram retirados e processados, diferentemente, para obtenção celular.

Os pulmões foram depositados em placa de 90x15 (KASVI) e digeridos com 12 mL de tampão colagenase por 30 minutos, em estufa de 37 °C com 5% de CO_2. Após o período de digestão, os pulmões foram macerados e as células totais separadas utilizando *cell strainer* (BD Falcon 70 µm). As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x estéril para retirar todo o tampão colagenase. Os eritrócitos foram lisados após lavagem com tampão hemolítico (0,15 M NH_4Cl, 1 mM $KHCO_3$, 0,1 mM Na_2EDTA, pH 7,2-7,4).

Os linfonodos, paratímicos e axilares, foram macerados em placa de 60x15 (KASVI) com 1 mL de PBS 1x estéril. Os eritrócitos foram lizados após lavagem com tampão hemolítico.

As suspensões celulares dos pulmões e linfonodos foram submetidas a contagem em câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de Trypan para verificar a viabilidade das mesmas. Posteriormente, as células foram ajustadas na concentração de $1x10^6$ em 99 µl de PBS 1x contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab – Campinas, Brasil) para futura marcação com anticorpos.

3.4.5.2 Fenotipagem celular pulmonar

Camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram infectados, como descrito na sessão **3.4.2**, por 15 e 30 dias. Após cada período de infecção, os animais foram eutanasiados e os pulmões retirados para obtenção das células totais, descrito na sessão **3.4.5**. As células ajustadas foram incubadas com anticorpos (Quadro 1), que reconhecem e bloqueiam receptores na porção Fc na membrana das células, na concentração de 1:100 por 30 minutos no escuro e no gelo. Após

a incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1x com 3% SFB. Em seguida, as células foram ressuspendidas e adquiridas por citômetro de fluxo (FACsCanto-Becton Dickinson). Para distinguir células auto fluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizamos a metodologia de fluorescence-minus-one (FMO) (ROEDERER et al., 2001). Os anticorpos utilizados para marcação das populações celulares foram:

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
C11b	FITC	M1/70
F4/80	PerCP	BM8
GR1	APC	RB6-8C5
CD11c	APC	N418
MCH-II	PE	M5/114.15.2
CD3	PerCP	145-2C11
CD4	FITC	RM4-5
CD8	APC	53-6.7
NK1.1	APC	PK136

Quadro 1. Fenotipagem pulmonar - Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience.

3.4.5.3 Fenotipagem do linfonodo

Camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$, infectados por 30 dias, tiveram seus linfonodos paratímicos e axilares retirados e processados, descrito na sessão **3.4.5**. As células totais foram marcadas com os seguintes anticorpos:

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
CD3	PerCP	145-2C11
CD4	FITC	RM4-5
CD8	APC	53-6.7

Quadro 2. Fenotipagem das células do linfonodo - Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience.

3.4.5.4 Cinética - Recrutamento de neutrófilos

Camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram infectados por 1, 3 e 5 dias. Após cada período de infecção, os pulmões foram retirados para obtenção de células totais, descrito na sessão **3.4.5**. Em seguida, as células ajustadas foram marcadas com os anticorpos descritos a seguir.

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
C11b	FITC	M1/70
GR1	APC	RB6-8C5

Quadro 3. Recrutamento de neutrófilo - Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience.

3.4.5.5 Determinação de citocinas intracelulares de linfócitos T CD4^{+} e T CD8^{+} e marcação de células T reg.

Os camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram infectados, descrito na sessão **3.4.2**, e após 30 dias de infecção os animais foram eutanasiados para a retirada dos pulmões. Foram extraídas as células pulmonares totais e incubadas com Brefeldina A (1 μL da solução 1000x concentrada em 999 μL de R10) por 12 horas em estufa à 37 °C com 5 % de CO_2, para interromper o processo de liberação das citocinas, acumulando-as no interior do citoplasma.

Após a incubação, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo "V" para o início da marcação. Utilizou-se os anticorpos descritos no Quadro 4 para realizar a marcação de superfície. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 3% SFB e fixadas com 100 μL da solução fixação do Kit "Fixation & Permeabilization" (eBioscience

cat. 88-8823-88) durante 15 minutos em gelo e no escuro. Posteriormente, realizou-se outra lavagem seguida da adição de 100 μL de solução permeabilizadora do mesmo Kit e incubadas por 5 minutos. Realizou-se outra lavagem, adicionou-se os anticorpos diluídos também na solução permeabilizadora (1:100) e incubamos por 20 minutos. Os anticorpos utilizados estão descritos no Quadro 4. Após a incubação as células foram novamente lavadas e ressuspendidas em 250 μL de PBS 3% SFB e transferidas para tubos específicos para Citometria de Fluxo.

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
CD3	PerCP	145-2C11
CD4	FITC	RM4-5
CD4	PE	H129.19
CD8	APC	53-6.7
CD25	PE-Cy7	PC61.5
IFN-γ	FITC	Cat. 554411
IL-17	PE	Cat. 559502
FoxP3	Alexa Fluor 488	150D/E4

Quadro 4. Perfil de citocinas intracelulares e de células Treg - Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience.

3.4.5.6 Estratégia de análise das populações celulares

A análise dos dados foi inicialmente baseada no perfil de dispersão frontal/tamanho relativo (FSc), para parâmetros de altura (H) *versus* área (A) (FSC-H X FSC-A). A finalidade de tal estratégia é a eliminação dos *doublets* - células que ao serem adquirida pelo citômetro passam de forma agrupada. A exclusão é feita pela seleção das células a serem analisadas por meio de um *gate* (Figura 6A). Após a exclusão dos *doublets*, as células foram analisadas quanto ao perfil de dispersão lateral do feixe luminoso/granulosidade relativa (SSc) *versus* FSc (SSc X FSc), afim de analisar granulosidade e tamanhos relativos das populações. Dessa

forma o perfil celular foi selecionado pela inserção de um novo *gate* que delimita a população a ser analisada (Figura 6B). A partir desse *gate* as populações específicas foram determinadas de acordo com a positividade para os marcadores específicos da população de interesse (Figura 6C).

A análise dos dados foi realizada pelo programa FlowJo.

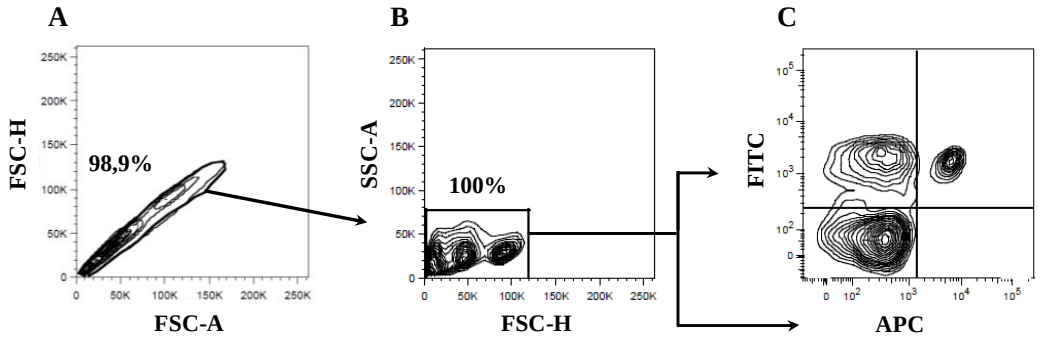

Figura 6. Estratégia de *gate*. (A) Exclusão dos *Doublets*. (B) Seleção do perfil celular a ser analisado. (C) Determinação de positividade para os marcadores FITC e APC. As imagens são referentes a uma das análises de fenotipagem pulmonar realizadas no presente trabalho.

3.4.6 Histopatologia

Após 30 dias de infecção, os animais C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram eutanasiados para remoção do pulmão total. Os pulmões foram colocados em cassetes e, posteriormente, embebidos em solução Carnoy-Fixador (60% metanol + 30% clorofórmio + 10% ácido acético). As secções (5 μm) foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), para análise de infiltrado celular, e com a coloração *Groccot*, para visualização dos fungos.

3.4.7 Proliferação celular

3.4.7.1 Obtenção celular

Animais C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram infectados intratraquealmente, descrito na sessão **3.4.2**, por 30 dias. Após o período de infecção, os animais foram eutanasiados com auxílio de câmara de CO_2 para retirada do baço. O órgão foi macerado em placa de petri de 60x15 (Kasvi) contendo 1 mL de PBS 1x estéril (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na2HPO4, 1.5 mM KH2PO4, pH 7.2-7.4, filtrado 0,2 μm). O material foi transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado à 1800 rpm para exclusão do sobrenadante. Em seguida, realizamos a hemólise da amostra com tampão hemolítico. As células foram ajustadas em concentração de $5x10^7$ em 400 μL para a marcação com Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE).

3.4.7.2 Marcação com CFSE

As células ajustadas foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x estéril, pré-aquecido, contendo 1,25 μM de CFSE. A suspensão foi incubada em banho seco à 37 °C, envolto em papel alumínio, por 10 minutos. A cada 2 minutos de incubação realizou-se homogeneização da amostra para maior eficiência da marcação. Após o período de incubação, as células foram lavadas 3x com meio RPMI e, em seguida, ajustadas na concentração de $3x10^5$/50 μL e plaqueadas em placa com fundo "U". Adicionou-se 150 μL de meio R10 contendo os estímulos: Para o controle positivo - *Phitohemaglutinina* (PHI) e para estímulo específico - CFA. A placa foi embalada com papel alumínio e incubada na estufa à 37 °C com 5% CO_2 por 5 dias. Após o período de incubação, lavou-se os poços com PBS 1X, as células foram ressuspendidas em 200 μL de PBS 1X e transferidas para tubos de citometria. A leitura foi realizada em citômetro de Fluxo (FACSCantoII, BD) e análise no software FlowJo.

3.4.8 Ensaio de depleção de células T $CD8^+$

A depleção de células T $CD8^+$ foi realizada pelo tratamento de camundongos $TLR3^{-/-}$ com o anticorpo monoclonal 53.6.7 (Anti-CD8), gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. José Ronnie Carvalho Vasconcelos. Nos dias -7, -5, -3 e -1 antes da infecção com leveduras Pb18, descrita na sessão **3.4.2**, os camundongos foram injetados, intraperitonealmente, com a dosagem de 0,5 mg do Anti-CD8 ou IgG rat controle. Após 2 dias da infecção, cada camundongo recebeu mais uma dose de 0,5 mg de Anti-CD8 ou IgG rat controle. O tratamento foi mantido a cada 3 dias, até completar 30 dias de infecção. O protocolo de depleção das células T $CD8^+$ foi baseado no artigo de VASCONCELOS et al, 2012, com modificações.

Após o período de infecção, foi realizada a análise de UFC e dosagem das citocinas IFN-γ e IL-17, como descrito nas sessões 3.4.3 e 3.4.4.1, respectivamente.

3.5 Ensaios *In vitro*

3.5.1 Cultura de células

3.5.1.1 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento para diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

A linhagem de células L929 consiste em fibroblastos imortalizados de camundongo, que possuem capacidade de secretar fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) em seu sobrenadante. Dessa forma, o sobrenadante destas células foi utilizado como fonte de M-CSF para diferenciação de BMDM de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$. Para obtenção do sobrenadante, as células foram ajustadas na concentração de $1x10^5$ por mL e foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich) acrescido de 10% e soro fetal bovino (SFB), (Cultilab – Campinas, Brasil) por 7 dias em estufa à 37 °C com 5% de CO_2. Após este período, o sobrenadante, contendo M-CSF, foi centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos, para retirar totalmente as células presentes nele, em seguida, foi filtrado e estocado em nitrogênio líquido até o momento do uso.

3.5.1.2 Diferenciação de Macrófagos derivado de medula óssea (BMDM) de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$

Foram retirados os fêmures de camundongos, C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$, e em seguida colocados em imersão de álcool 70 % por 5 minutos em placa de petri. Os ossos foram cortados em suas extremidades e, em seguida, foi injetado meio RPMI, com uma seringa de 10 mL e uma agulha de insulina, no orifício do osso para lavagem e obtenção das células da medula óssea. As células obtidas do lavado foram colocadas em tubo Falcon com mais 10 mL de RPMI, e posteriormente centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspendido 5 mL de meio RPMI. As células foram contadas na câmara de Neubauer e ajustadas para $2x10^6$ por placa de petri contendo 10 mL de meio R20/30 (5 mL de RPMI 10% SFB e 5 mL do sobrenadante da L929). No 3° e 5 ° dia, acrescentou-se mais 10 mL deste mesmo meio. No 7° dia os macrófagos apresentaram perfil diferenciado possibilitando sua utilização em ensaios *in vitro*. O fenótipo foi analisado por Citometria de Fluxo (FacsCanto) utilizando os seguintes marcadores de superfície:

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
F4/80	PerCP	BM8
CD11b	FITC	M1/70

Quadro 5. **Caracterização de macrófagos -** Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience

3.5.2 Ensaio de interação entre BMDM e leveduras da cepa Pb18

Os BMDM, já diferenciados, foram contados na câmara de Neubauer utilizando azul de Trypan, para excluir as células mortas, ajustados na concentração de $2x10^5$ em 750 µL de R10 e plaqueados em placa de 24 poços (Corning Incorporated - Costar 3526). As células foram mantidas em estufa à 37 °C com 5% de CO_2 por 12 horas para melhor adesão. Posteriormente, foi adicionado o inóculo da cepa Pb18, ajustado na concentração de $2x10^5$ leveduras em 50 µL de meio R10, de modo que cada poço tivesse volume final de 800 µL e mantivesse a relação de 1 BMDM para 1 levedura (1:1).

3.5.3 Ensaio de fagocitose

Os BMDM foram ajustados na concentração de $2x10^5$ células em 50 µL de R10. As células foram adicionadas em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO_2 por 12 horas para melhor adesão. Passado esse tempo, realizou-se a interação com $2x10^5$ de leveduras de Pb18/ poço e incubou-se em estufa à 37 °C com 5% de CO_2 por 4 horas. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram retiradas e coradas pelo Kit hematológico Instant-Prov (NewProv). Em seguida, realizou-se a fixação das mesmas com Entellan (MERCK) em lâminas para microscopia (PRECISION). A fagocitose foi analisada por microscopia ótica de acordo com Campos et al (2006). O índice foi definido como o produto da porcentagem de BMDM que fagocitaram e do número médio de leveduras fagocitadas por estas células.

3.5.4 Determinação de Unidades Formadoras de Colônia

Após, 4, 12 e 24 horas de interação dos BMDM com o fungo, o sobrenadante foi retirado e 100 µL, do mesmo, foi plaqueado em meio BHI5 (BHI acrescido de 5% de SFB).

Essas placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 1 semana. O restante do sobrenadante (700 µL) foi armazenado a -20 °C para análises de citocinas por ELISA. Este procedimento teve como finalidade analisar e quantificar os fungos presentes de forma livre no sobrenadante.

Nas células aderidas aos poços, foi adicionado 1 mL de água destilada estéril para induzir a lise das mesmas. Após 10 minutos, homogeneizamos os poços, vigorosamente, com pipeta de 1000 µL e, em seguida, coletamos 100 µL deste homogenato, plaqueamos em meio BHI10 e cultivamos por 1 semana em estufa a 37 °C. Posteriormente, realizamos a contagem das UFCs.

3.5.5 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A concentração de NO foi medida do sobrenadante de BMDM. As células foram plaqueadas ($2x10^5$/poço) e incubadas com leveduras de Pb18 por 4 horas, na proporção de 1:1. Posteriormente, recolheu-se o sobrenadante para realização da dosagem de NO. Utilizou-se o equipamento Sievers ® Óxido Nítrico Analyzer (NOA 280) que oferece um sistema de detecção mais versátil para análise do NO.

3.5.6 Expressão de moléculas coestimulatórias

Após 24 horas de interação dos BMDM ($5x10^5$/poço) com o fungo (proporção 1:1) em placa de 24 poços, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x para retirar das leveduras não fagocitadas. Em seguida, as células foram destacadas por pipetação com auxílio de PBS 1x gelado. A expressão das moléculas coestimulatórias foi analisada por Citometria de Fluxo (FacsCanto) utilizando os seguintes marcadores de superfície:

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
CD80	FITC	16-10A1
CD86	FITC	GL1
CD40	PE	3/23
MHC-II	PE	2G9
MHC-I	FITC	AF6-88.5

Quadro 6. Caracterização das moléculas coestimulatórias - Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience.

3.5.7 Análise de expressão gênica

3.5.7.1 Extração de RNA total

O isolamento do RNA total foi realizado com o reagente Trizol (invitrogen), segundo as indicações do fabricante, acrescentando um passo de incubação a 65 °C por 10 minutos após a adição do reagente. Uma alíquota (1 µL) de cada amostra de RNA foi quantificada pelo Nanodrop, que exibe uma curva pico em 260 nm. Proteínas apresentam um pico de absorbância a 280 nm e outros contaminantes (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) apresentam pico de absorbância em torno de 230 nm. Por isso, a razão das absorbâncias 260/280 nm é frequentemente utilizada para avaliar a contaminação por proteínas, sendo o valor de referência (amostra livre de proteínas) igual a 2.0.

3.5.7.2 Síntese de cDNA

Após a quantificação do RNA, sintetizamos cDNA utilizando o "RT-first strand kit" (QIAGEN). Primeiramente, cada amostra foi tratada com tampão GE2 (QIAGEN) para eliminar o DNA genômico. Então, cada reação obteve 12.5 µL de RT-qPCR mastermix, 10.5 µL de ddH_2O e 1 µL de amostra e foi analisada para os diferentes genes por PCR array, como descrito a seguir.

3.5.7.3 PCR Array

Para análise de expressão gênica foi utilizado um sistema de PCR *Array Real Time* customizado (QIAGEN). Esta técnica permite a análise simultânea de diferentes genes envolvidos na resposta imune. Além dos genes de interesse, as placas contêm 5 controles endógenos que garantem sensibilidade, especificidade e alta reprodutibilidade dos resultados, sendo ele – *β2m*, *gapdh*, *mgdc*, *rtc* e *ppc*. A análise dos possíveis mecanismos envolvidos na PCM experimental foi realizada utilizando os genes da resposta inata (*tlr2, tlr4, clec7a, mrc1, card9, nlrp3 e myd88).*

As reações foram realisadas em triplicata biológica. Após a amplificação das amostras, os cálculos da expressão diferencial foram realizados por um programa específico de análises de dados, cedido na página da empresa. Os genes que apresentarem valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realisadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK et al., 2001). Desta forma os dados foram representados como na expressão gênica, que foi normalizada pela média geométrica de cinco genes de controle endógeno.

3.5.8 Citotoxicidade de linfócitos T CD8$^+$

3.5.8.1 Purificação de linfócitos T CD8$^+$

Camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ (3 animais/grupo) foram infectados, descrito na sessão **3.3.2**. Após 30 dias de infecção os animais foram eutanasiados e o baço removido para a purificação de células T CD8$^+$. A purificação foi realizada por seleção negativa usando CD4$^+$ T *Cell Isolation* Kit, *mouse* - Miltenyi Biotec. A análise da pureza das células foi realizada por Citometria de Fluxo (FACS Canto II). Os anticorpos usados para marcação foram:

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
CD3	PE	145C11
CD4	FITC	L3T46K1.5
CD8	APC	53-6.7

Quadro 7. Caracterização de células T CD4$^+$ e T CD8$^+$ - Relação de anticorpos com seus respectivos fluoróforos e clones. BD Bioscience

3.5.8.2 Ensaio de citotoxicidade

BMDM de camundongos C57Bl/6, descrito na sessão **3.5.1.2**, foram ajustados na concentração de 5 × 10^7 células/mL e, em seguida, foram marcados com 10 μM de Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester (CFSE – Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) pré-aquecido em meio PBS/0.1 % BSA, de acordo com a bula do corante. Após a marcação, a suspensão de macrófagos foi ajustada na concentração de 1 × 10^5 cells/ mL e cultivada por 24 horas à 37 °C com 5 % de CO_2 em placa de 24 poços *overnight*. Então, as células foram incubadas com leveduras Pb18 (proporção 1:1) à 37 °C por 4 horas. Posteriormente, realizou-se uma lavagem dos poços com PBS 1x estéril para remover as leveduras não internalizadas. Em seguida, os linfócitos T CD8$^+$ de camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ purificados foram adicionados na proporção 5:1 (5x10^5 de células TCD8$^+$ para 1x10^5 BMDM) e a interação foi incubada por 4 horas à 37 °C com 5 % de CO_2. Após a incubação, os linfócitos T CD8$^+$ foram removidos com PBS/10 mM EDTA e guardados em Tryzol à -20 °C para futura análise da expressão de granzima e perforina. Os BMDM aderidos foram destacados dos poços utilizando PBS 1x estéril gelado, em seguida, foi adicionado 1 μL de Propidium Iodide Staining Solution (PI) – (BD Bioscience) por poço. A viabilidade dos macrófagos foi analisada por Citometria de Fluxo (FACS Canto II), onde as células viáveis eram CFSE$^+$ e as inviáveis CFSE$^+$PI$^+$.

3.5.8.3 Expressão de Perforina e Granzima por Real-Time PCR (qRT-PCR)

Os linfócitos T CD8$^+$ estocados em Tryzol no ensaio de citotoxicidade, foram submetidos à extração de RNA e síntese de cDNA, descritos nas sessões **3.5.7.1** e **3.5.7.2** respectivamente.

Para as reações de qRT-PCR foram utilizados, 5 μL de cDNA, 5 pmol de cada *primer*, 10 μL de SYBR Green Master Mix (2x) ROX Solution Provided (Fermentas). Para que o volume final das reações fosse de 25 μL, foi utilizado água DEPEC para os ajustes.
Os *primers* utilizados no qRT-PCR estão descritos na tabela a seguir:

Primer	***Foward***	***Reverse***
Granzyme B (*gzmb*)	TGCTGCTAAAGCTGAAGAGTAAG	CGTGTTTGAGTATTTGCCCATTG
Perforin 1 (*prf1*)	GCTCCCACTCCAAGGTAGC	TTTGTACCAGGCGAAAACTGT

Quadro 8. Relação de primers utilizados para análise da expressão de transcritos de perforina e granzima por Real Time-PCR

3.5.8.4 Viabilidade das leveduras

Após o término do ensaio de citotoxicidade, o sobrenadante das interações foi recolhido e centrifugado à 1800 rpm, para excluir toda célula e/ou levedura presente. Utilizou-se um repique de Pb18 com 2 semanas de crescimento, a fim de obter o máximo de leveduras viáveis, para preparação do inóculo à ser interagido com os sobrenadantes. Em uma placa de 24 poços adicionou-se o fungo ($1x10^6$ de leveduras) e os sobrenadantes e incubou-se por 24 horas à 37 °C com 5 % de CO_2. Posteriormente, foi recolhido todo material do poço e centrifugado à 1800 rpm. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se as leveduras com 1 mL de PBS 1X e adicionou-se 1μL de PI. Em uma lâmina, foi preparado "botões" de meio sólido (PBS 1X - 1 % agarose) para suporte da suspensão de leveduras, adicionou-se 30 μL da suspensão no "botão" da lâmina e analisou-se por microscopia as leveduras viáveis (PI^-) e inviáveis (PI^+).

3.5.9 Análise Estatística

A análise estatística aplicada aos resultados foi realizada no programa *Prism Graph Pad* pelo teste One-Way ANOVA, e múltiplas comparações foram feitas pelo teste de Tukey (ZAR, 1984).

4. RESULTADOS

3.6 Avaliação da carga fúngica pulmonar e histopatológica

Para avaliar o papel de TLR3 no curso da doença, camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram infectados e, após 30 dias, os pulmões foram retirados para análises de UFC e histopatológica. Observamos que os animais TLR3$^{-/-}$ tiveram redução significativa da carga fúngica pulmonar quando comparados aos animais C57Bl/6 (Figura 7A). Esse resultado também pôde ser observado na análise histopatológica com coloração por Grocott (Figura 7B e C), onde os animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram menor presença de estruturas fúngicas no pulmão. Na coloração por HE observamos maior infiltrado celular inflamatório no pulmão dos animais C57Bl/6 quando comparado aos TLR3$^{-/-}$ (Figuras 7D e E respectivamente).

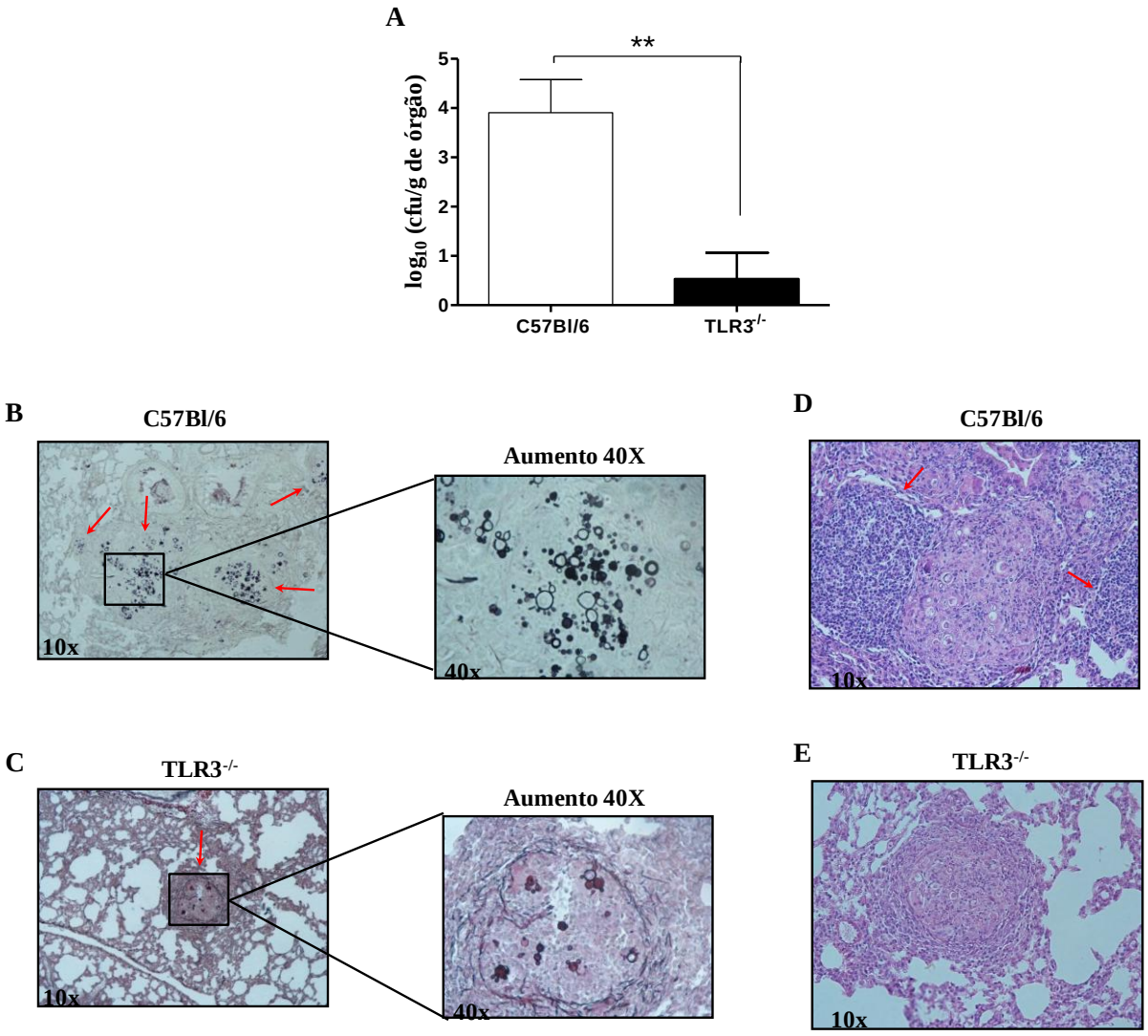

Figura 7. Ausência de TLR3 promove redução da carga fúngica no pulmão. Camundongos C57BL/6 e TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias de infecção os animais foram eutanasiados e os pulmões obtidos para (A) análise de unidades formadoras de colônia. (B) Histopatologia com coloração *Grocott* – coloração de metanamina de prata de *Grocott* (flechas vermelhas – presença do fungo) do pulmão dos camundongos C57Bl/6 e (C) dos camundongos TLR3$^{-/-}$. (D) Histopatologia com coloração HE - coloração de hematoxilina e eosina (flechas vermelhas – infiltrado inflamatório) do pulmão dos camundongos C57Bl/6 e (E) dos camundongos TLR3$^{-/-}$. Os dados são representativos de 5 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (*P <0,05 e **P <0,01).

3.7 Caracterização de subpopulações celulares do infiltrado pulmonar

Dada à importância de investigar as diversas populações celulares atuantes no órgão alvo após 30 dias de infecção, as células totais pulmonares de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram retiradas e ajustadas para marcação com anticorpos específicos de cada população celular a ser analisada: anti-CD3/anti-CD4, anti-CD3/anti-CD8, anti-CD11c/anti-MHC-II e anti-CD11b/anti-GR1. Observamos que apesar da porcentagem celular CD3^{+}/CD4^{+} ser semelhante entre os camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ (Figura 8A), ao analisarmos o número absoluto encontramos aumento significativo dessas células nos animais C57Bl/6 em comparação aos animais TLR3$^{-/-}$ (Figura 8A1). Em relação às células CD3^{+}/CD8^{+}, observamos que a ausência de TLR3 induziu aumento tanto na porcentagem (Figura 8B), quanto em números absolutos em relação aos animais C57Bl/6 (Figura 8B1). Ao avaliarmos o recrutamento de células CD11c^{+}/MHC-II^{+} para o pulmão, observamos que os animais TLR3$^{-/-}$ exibiram porcentagem semelhante à dos animais C57Bl/6 (Figura 8C), o mesmo foi observado quanto ao número absoluto de ambas as linhagens (Figura 8C1). Por fim, investigamos o infiltrado de células CD11b^{+}/GR1^{+} pulmonares e notamos porcentagem semelhante entre as linhagens (Figura 8D), contudo, ao analisarmos o número absoluto observamos significativa diminuição nos animais TLR3$^{-/-}$ em relação ao grupo C57Bl/6 (Figura 8D1).

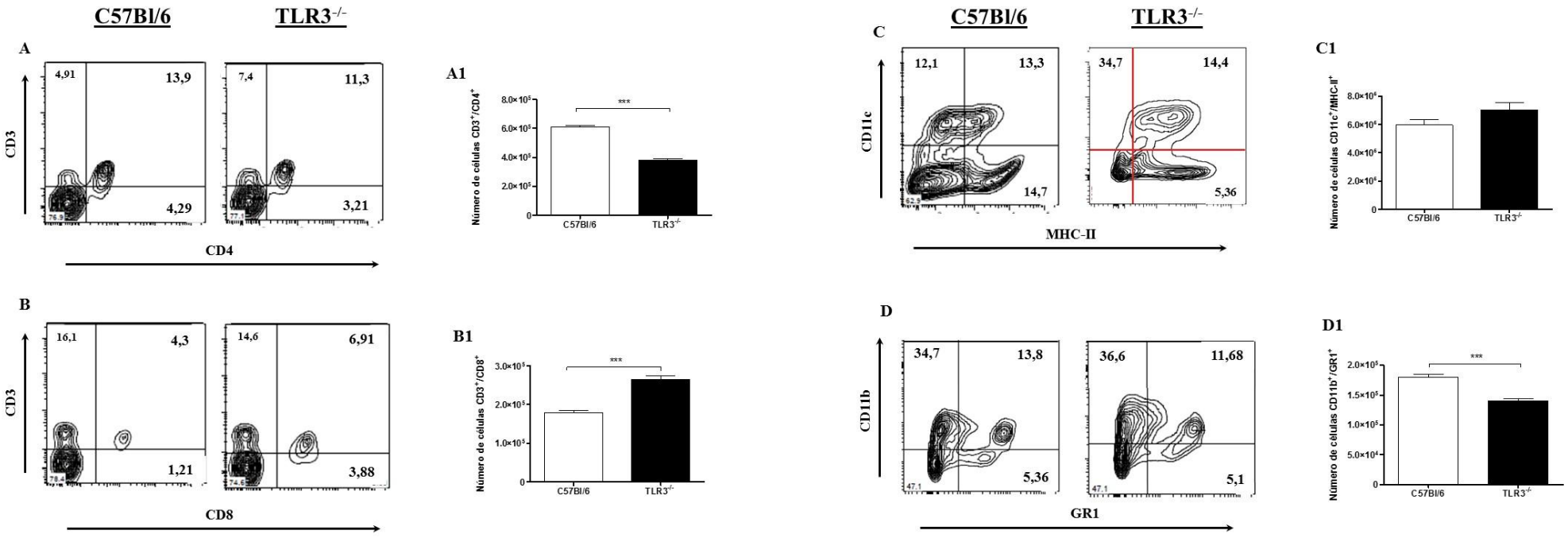

Figura 8. Animais TLR3$^{-/-}$ tem aumento de células T CD8 pulmonares. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de 5x10^{5} para a realização da marcação de populações celulares específicas. (A) Porcentagem de células CD3^{+}/CD4^{+} representativa de 1 animal e (A1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura A. (B) Porcentagem de células CD3^{+}/ CD8^{+} representativa de 1 animal e (B1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura B. (C) Porcentagem de células CD11c^{+}/ MHC-II^{+} representativa de 1 animal e (C1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura C. (D) Porcentagem de células CD11b^{+}/GR1^{+} representativa de 1 animal e (D1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura D. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Nos gráficos de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 4 experimentos (***P<0,0001).

3.8 Perfil de citocinas pulmonares

O padrão de citocinas induzido em resposta à PCM pode determinar o curso da doença. Dessa forma, após 30 dias de infecção, o pulmão dos camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram retirados, macerados e o sobrenadante utilizado para a dosagem das citocinas IL-17, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-12. Observamos aumento significativo na produção de IL-17, IFN-γ, IL-1β e IL-6 nos animais TLR3$^{-/-}$ em relação ao grupo C57Bl/6, enquanto a produção de IL-10 e IL-12 se mantiveram semelhante entre as linhagens (Figura 9).

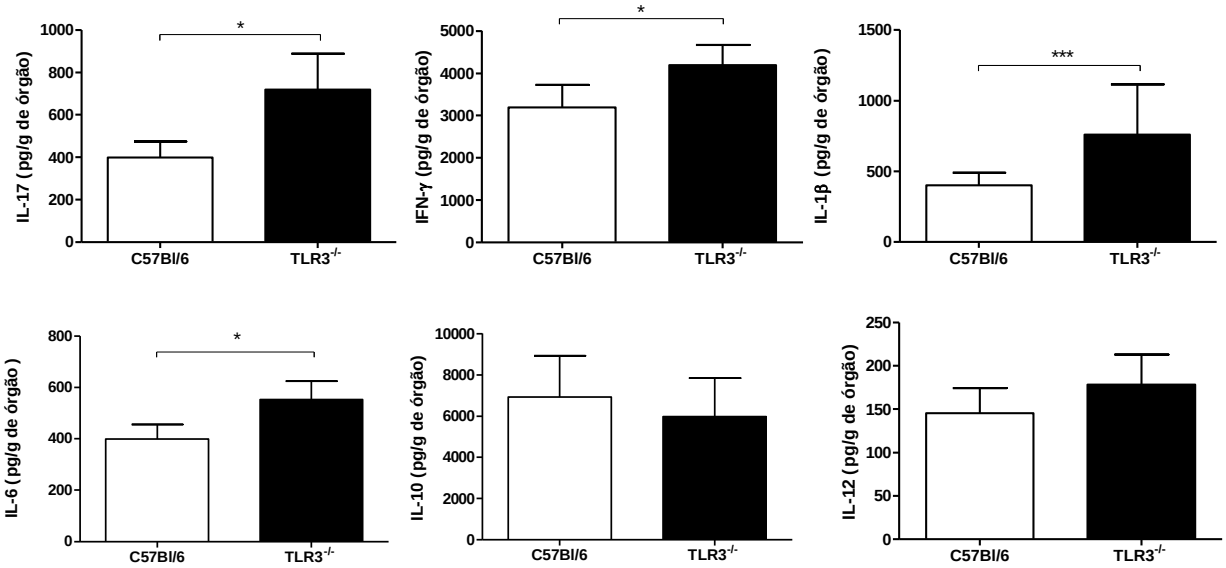

Figura 9. *P. brasiliensis* induz aumento de citocinas de padrão Th1 e Th17 no pulmão de camundongos TLR3$^{-/-}$. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias, os pulmões foram obtidos, macerados e seu sobrenadante coletado para análise das citocinas IL-17, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-12, por ELISA. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (*P<0,05 e ***P<0,0001).

3.9 Caracterização de células T nos linfonodos regionais à infecção

Durante a infecção os linfócitos permanecem em plena atividade proliferativa nos linfonodos regionais. Para investigar o perfil de células T presente nos linfonodos após 30 dias de infecção, os linfonodos axilares e paratímicos foram removidos e as células totais obtidas para marcação com anticorpos específicos de cada população celular a ser analisada: anti-CD3/anti-CD4 e anti-CD3/anti-CD8. Observamos que os animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram menor porcentagem de células CD3^{+}CD4^{+} que os animais C57Bl/6 (Figura 10A). Em relação ao número absoluto, houve diminuição significativa dessas células na ausência de TLR3 (Figura 10A1). A porcentagem celular CD3^{+}CD8^{+} de ambas as linhagens apresentaram valores semelhantes (Figura 10B), contudo em números absolutos os animais C57Bl/6 apresentaram números superiores aos animais TLR3$^{-/-}$ (Figura 10B1).

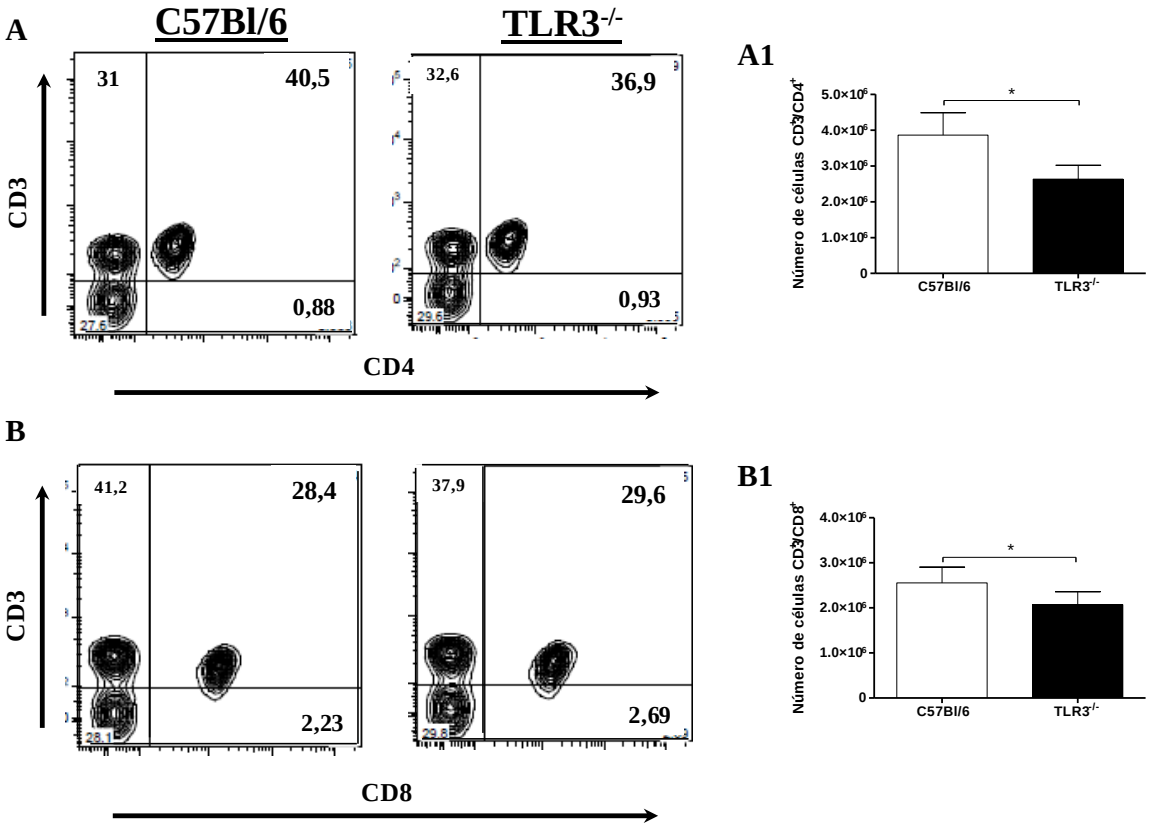

Figura 10. Camundongos TLR3$^{-/-}$ tem diminuição nas populações de células T CD8^{+} e T CD4^{+} nos linfonodos após infecção. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias as células totais dos linfonodos, axilares e paratímicos, foram obtidas e ajustadas na concentração de 1x10^{6} para a realização da marcação com anticorpos específicos. (A) Porcentagem de células CD3^{+}/CD4^{+} e (A1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura A. (B) Porcentagem de células CD3^{+}/CD8^{+} e (B1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura B. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Nos gráficos de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 4 experimentos (*P<0,05).

3.10 Perfil de citocinas dos linfonodos regionais à infecção

Para investigar o perfil de citocinas produzidos nos linfonodos regionais após 30 dias de infecção, o sobrenadante dos linfonodos foi utilizado para dosagem da produção de IFN-γ, IL-17, IL-12, IL-10, IL-1β, IL-6 e IL-4. Observamos que os animais TLR3$^{-/-}$ exibiram maior produção de IFN-γ, IL-17, IL-12, IL-6, IL-4 que os animais C57Bl/6, enquanto os níveis de IL-10 e IL-1β se mantiveram semelhantes entre as duas linhagens (Figura 11).

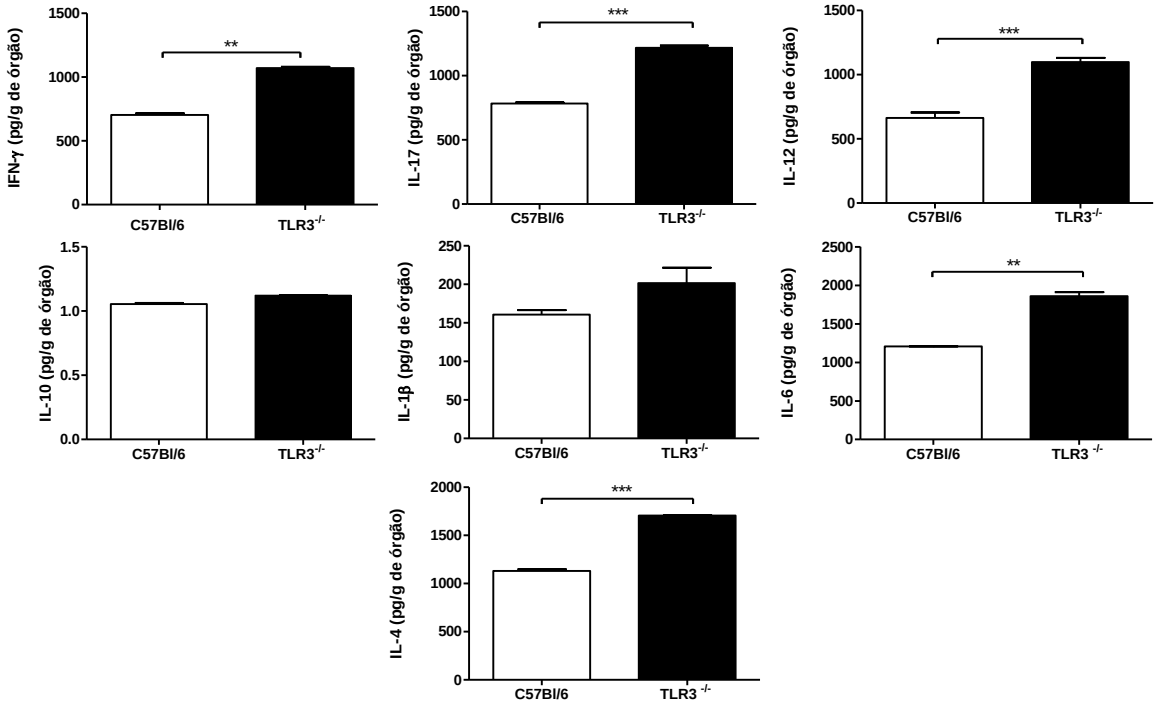

Figura 11. Ausência de TLR3 induz aumento de produção de citocinas nos linfonodos regionais. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias, os linfonodos, axilares e paratímicos, foram obtidos, macerados e seu sobrenadante utilizado para análise das citocinas de IFN-γ, IL-17, IL-12, IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-4, pela técnica de ELISA. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (**P <0,01 e ***P<0,0001).

3.11 Dosagem dos títulos IgG total e isotipos

A resposta humoral induzida na ausência de TLR3 foi investigada após 30 dias de infecção, onde os títulos de IgG total e seus isotipos IgG1 e IgG2a foram dosados. Observamos aumento significativo de IgG total nos animais TLR3$^{-/-}$ infectados em relação aos demais grupos (Figura 12A). Ao analisarmos a relação entre IgG1 e IgG2a, observamos aumento dos níveis de IgG1 sobre IgG2a em ambos os grupos infectados. Os títulos de IgG1 nos animais TLR3$^{-/-}$ se mostraram superiores aos títulos dos animais C57Bl/6 (Figura 12B).

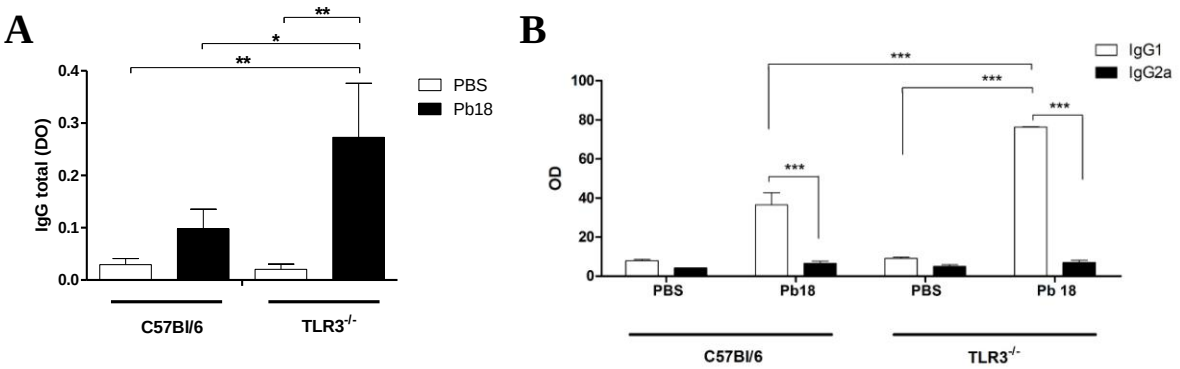

Figura 12. Camundongos TLR3$^{-/-}$ induzem maiores níveis de IgG após infecção. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18 ou PBS (grupo controle). O soro foi obtido por punção cardíaca 30 após a infecção. (A) IgG total e (B) os isotipos foram dosados pelo método de ELISA**.** Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (*P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,0001).

3.12 Análise intracelular de IFN-γ em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ pulmonares

A fim de investigar o perfil de citocinas produzidas pelas células T $CD4^+$ e $TCD8^+$ pulmonares dos animais C57Bl/6 e $TLR3^{-/-}$, após 30 dias de infecção as células totais dos pulmões foram obtidas para marcação de superfície com anticopos específicos para cada população a ser investigada: anti-CD3/anti-CD4 e anti-CD3/anti-CD8. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas para marcação intracelular com anti-IFN-γ. Observamos que embora os animais $TLR3^{-/-}$ tenham apresentado porcentagem semelhante de células $CD3^+/CD4^+$ pulmonares aos animais C57Bl/6, a porcentagem e o número absoluto de células $CD3^+/CD4^+/IFN\text{-}\gamma^+$ foi significantemente maior (Figura13A e 13A1 respectivamente). Tanto a porcentagem celular $CD3^+/CD8^+$ quanto à $CD3^+/CD8^+/IFN\text{-}\gamma^+$ dos animais $TLR3^{-/-}$ apresentaram-se aumentadas em relação aos animais C57Bl/6 (Figura 13B). Os animais $TLR3^{-/-}$ também apresentaram aumento significativo em números absolutos de células $CD3^+/CD8^+/IFN\text{-}\gamma^+$ em relação aos animais C57Bl/6 (Figura 13B1).

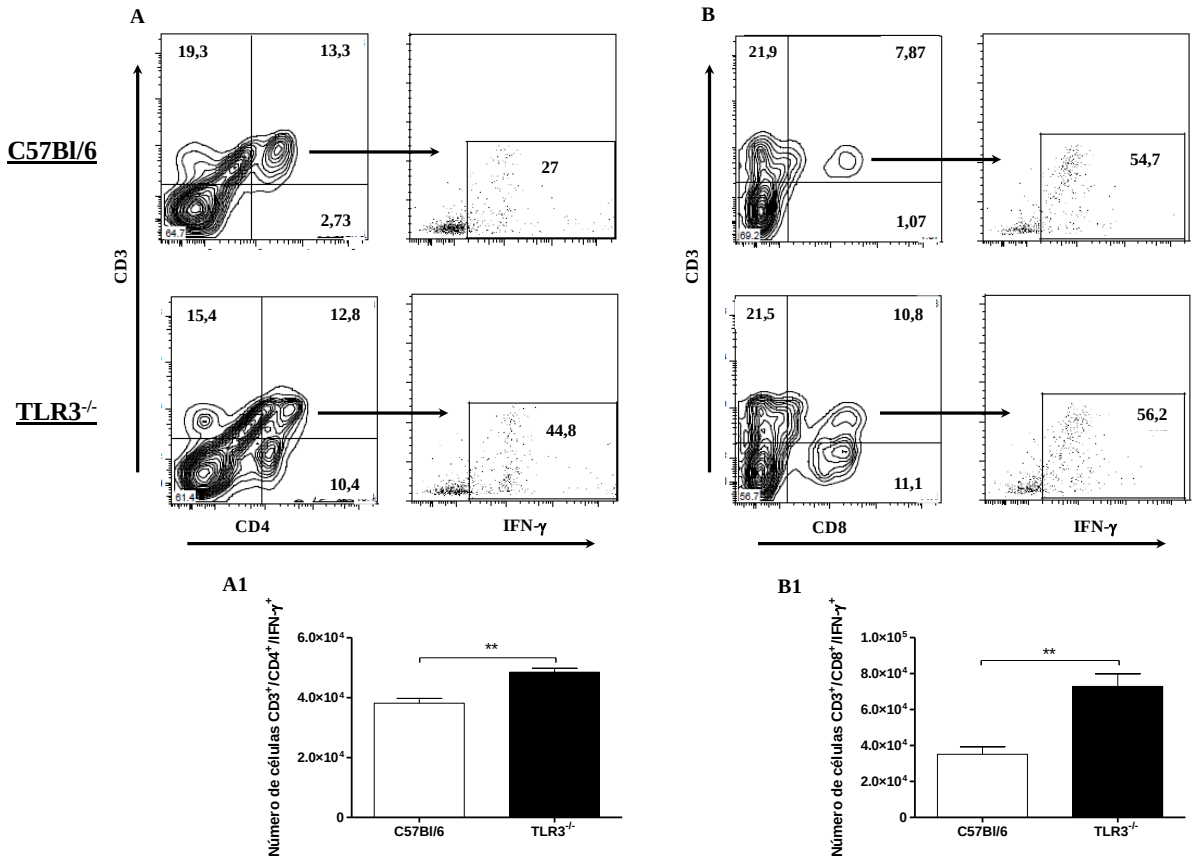

Figura 13. Aumento de células T CD4$^+$ e CD8$^+$ produtoras de IFN-γ é observado no pulmão de camundongos TLR3$^{-/-}$. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^6 leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias as células totais pulmonares foram incubadas com brefeldina por 10 horas. As células foram, então, marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IFN-γ. (A) *Contour plot* de células duplo positivas CD3/CD4 seguido de *Dot plot* com a porcentagem de IFN-γ produzido. (B) *Contour plot* de células duplo positivas CD3/CD8 seguido de *Dot plot* com a porcentagem de células produtoras de IFN-γ . (A1 e B1) Gráficos de barras correspondentes ao número absoluto de células CD3$^+$/CD4$^+$ e células CD3$^+$/CD8$^+$ ambas produtoras de IFN-γ, respectivamente. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Nos gráficos de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes (**P <0,01).

3.13 Análise intracelular de IL-17 em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ pulmonares

Investigamos também a produção de IL-17 pelas células $CD3^+/CD4^+$ e $CD3^+/CD8^+$ pulmonares após 30 dias de infecção. Os animais $TLR3^{-/-}$ apresentaram porcentagem semelhante de células $CD3^+/CD4^+$ aos animais C57Bl/6 (Figura 14A), no entanto a porcentagem $CD3^+/CD4^+/IL\text{-}17^+$ apresentaram aumentadas (Figura 14A). Quanto ao número absoluto de células $CD3^+/CD4^+/IL\text{-}17^+$, os animais $TLR3^{-/-}$ exibiram aumento significativo em relação aos animais C57Bl/6 (Figura 14A1). Os animais $TLR3^{-/-}$ também apresentaram maior porcentagem tanto de células $CD3^+/CD8^+$ quanto de células $CD3^+/CD8^+/IL\text{-}17^+$ (Figura 14B) em relação aos animais C57Bl/6. Em números absolutos os animais $TLR3^{-/-}$ exibiram aumento significativo de células $CD3^+/CD8^+/IL\text{-}17^+$ em relação aos animais C57Bl/6 (Figura 14B1).

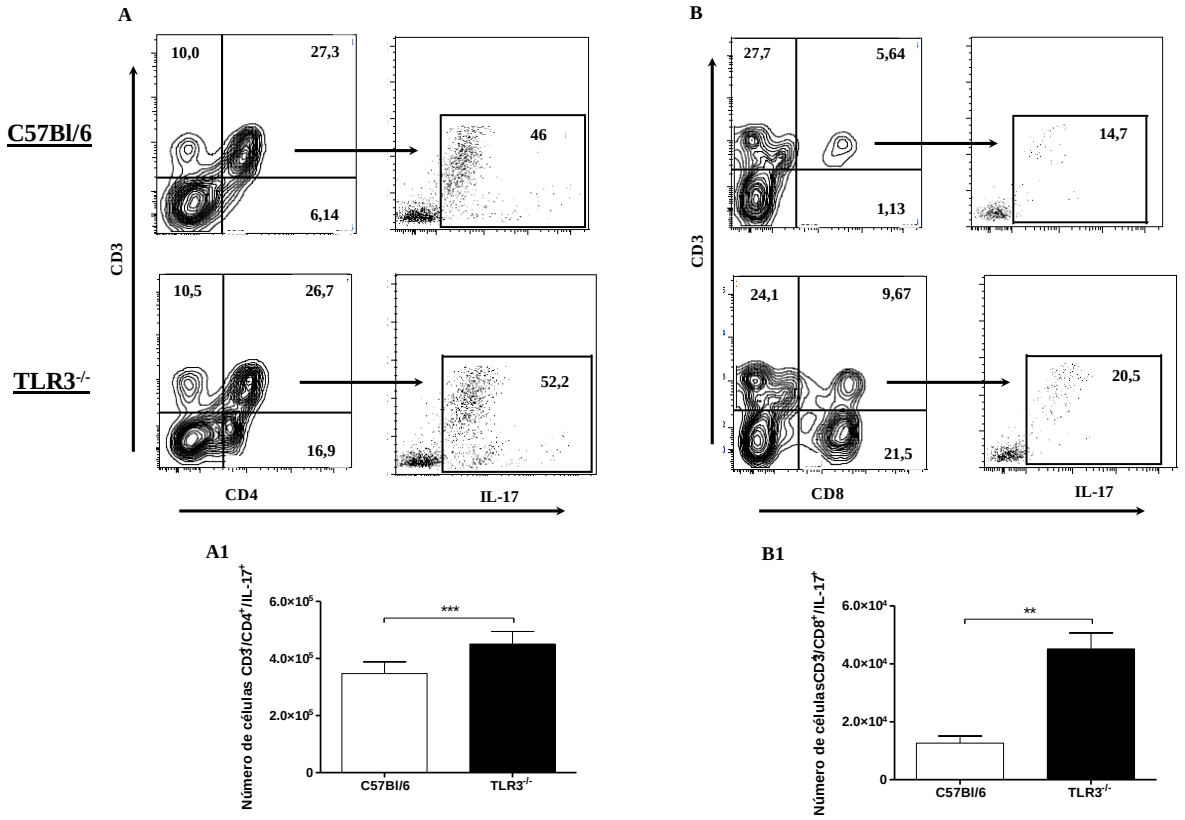

Figura 14. Aumento de células T CD4$^+$ e CD8$^+$ produtoras de IL-17 é observado no pulmão de camundongos TLR3$^{-/-}$. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^6 leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias as células totais pulmonares foram incubadas com brefeldina por 10 horas. As células foram, então, marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IFN-γ. (A) *Contour plot* de células duplo positivas CD3/CD4 seguido de *Dot plot* com a porcentagem de IL-17 produzida. (B) *Contour plot* de células duplo positivas CD3/CD8 seguido de *Dot plot* com a porcentagem de IL-17 produzida. (A1 e B1) Gráficos de barras correspondentes ao número absoluto de células CD3$^+$/CD4$^+$ e células CD3$^+$/CD8$^+$ ambas produtoras de IL-17, respectivamente. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Nos gráficos de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes (**P <0,01 e ***P<0,0001).

3.14 Caracterização de células T regulatórias pulmonares

Para pesquisar a população de células T regulatórias em camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ após 30 dias de infecção, os pulmões foram retirados e as células totais obtidas para marcação superficial com anticorpos específicos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas para marcação intracelular com FoxP3. Observamos que a porcentagem de células CD3^{+}/CD4^{+} exibiram uma pequena diferença entre as linhagens, onde os animais TLR3$^{-/-}$ apresentarem porcentagem inferior aos animais C57Bl/6 (Figura 15A). No entanto, a análise de CD25^{+}/FoxP3^{+}, a partir das células CD3^{+}/CD4^{+}, mostrou que os animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram maior porcentagem desse subtipo celular que os animais C57Bl/6 (Figura 15A). Em relação ao número absoluto de células CD3^{+}/CD4^{+}/CD25^{+}/FoxP3^{+}, os animais TLR3$^{-/-}$ exibiram números significativamente aumentados em relação aos animais C57Bl/6 (Figura 15A).

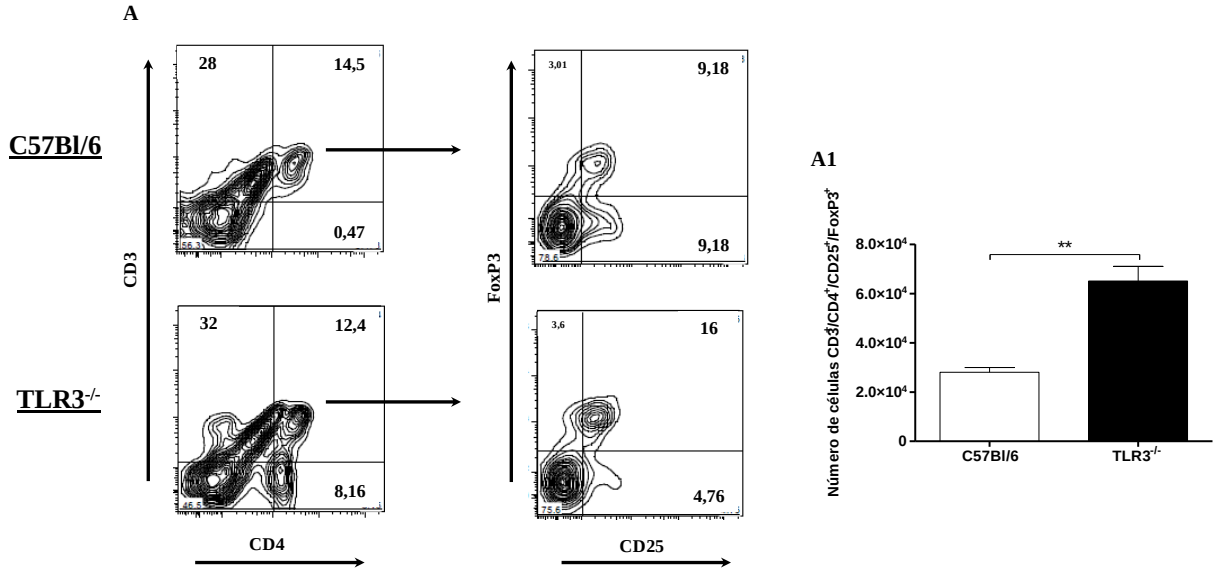

Figura 15. Aumento de células T regulatórias pulmonares é observado em camundongos TLR3$^{-/-}$. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias as células totais pulmonares foram incubadas com brefeldina por 10 horas. As células foram, então, marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-FoxP3. (A) *Contour plot* de células duplo positivas CD3/CD4 seguido de *Contour plot* de células duplo positivas CD25/FoxP3. (A1) Gráficos de barras correspondentes ao número absoluto de células CD3^{+}/CD4^{+}/CD25^{+}/FoxP3^{+}. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes (**P <0,01).

3.15 Análise da capacidade proliferativa de linfócitos T

No intuito de investigar a competência linfoproliferativa de ambas as linhagens, camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ tiveram o baço retirado após 30 dias de infecção, as células totais foram obtidas e coradas com CFSE e, em seguida, incubadas com ou sem estímulo por 5 dias. Como controle positivo de proliferação foi utilizado PFA como estímulo, que apresentou 62% de proliferação (dados não mostrados). As células sem estímulo de ambas as linhagens não apresentaram diferença de porcentagem entre elas, mantendo perfil basal de proliferação (Figura 16A e C). Observamos que as células provenientes dos animais TLR3$^{-/-}$ apresentam maior porcentagem de proliferação que os animais C57Bl/6 (Figura 16B e D). A avaliação da proliferação é observada pela queda de intensidade de fluorescência do marcador CFSE.

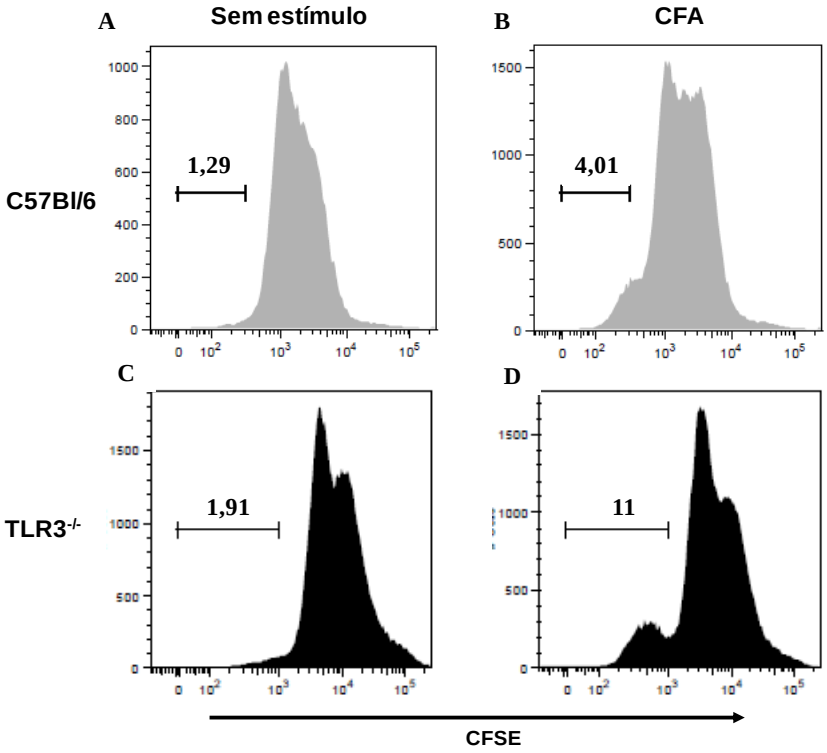

Figura 16. A ausência de TLR3 promove maior capacidade linfoproliferativa. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (4 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias o baço foi obtido e células totais preparadas para o ensaio de proliferação por 72 horas. (A e C) Células sem estímulo de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ respectivamente. (B e D) Células com estímulo específico CFA de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ respectivamente. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

3.16 Caracterização das populações de linfócitos pulmonares após 15 dias de infecção

Para investigar o perfil de linfócitos pulmonares após 15 dias de infecção, camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ tiveram o pulmão retirado e as células totais obtidas e ajustadas para marcação com anticorpos específicos de cada tipo celular a ser analisado: anti-CD3/anti-CD4 e anti-CD3/anti-CD8. Observamos que a porcentagem células CD3^{+}/CD4^{+} apresentaram pequena diferença entre as linhagens, onde os animais C57Bl/6 exibiram ligeiro aumento em relação aos animais TLR3$^{-/-}$ (Figura 17A), no entanto em relação ao número absoluto os animais TLR3$^{-/-}$ tiveram um aumento significativo ao compararmos com os animais C57Bl/6 (Figura 17A1). A porcentagem de células CD3^{+}/CD8^{+} também apresentou pequena diferença entre as linhagens, onde os animais TLR3$^{-/-}$ exibiram porcentagem ligeiramente maior que os animais C57Bl/6 (Figura 17B). Em relação ao número absoluto dessas células, os animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram aumento significativo ao compararmos com os animais C57Bl/6 (Figura 17B1).

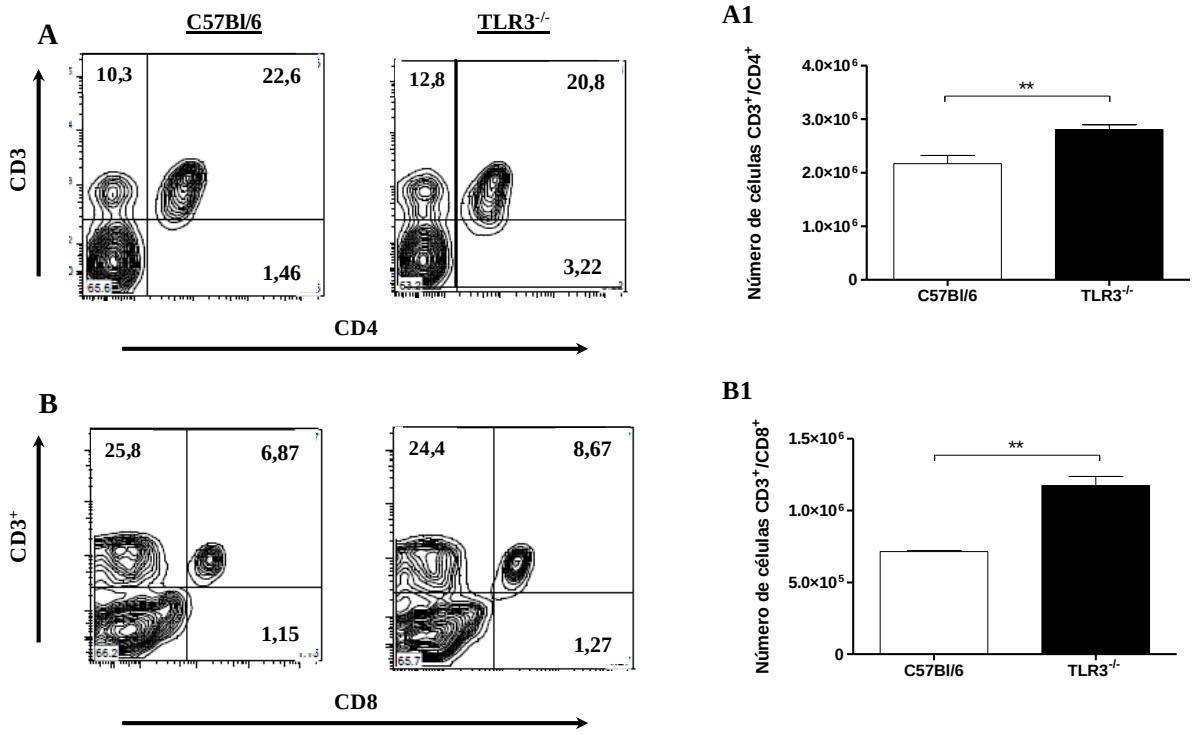

Figura 17. Camundongos TLR3$^{-/-}$ apresentam aumento de resposta celular após 15 dias de infecção. Camundongos C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com 1x10^{6} leveduras da cepa Pb18. Após 15 dias as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de 5x10^{5} para a realização da marcação de populações celulares específicas. (A) *Contour plot* com a porcentagem de células CD3^{+}/CD4^{+} e (A1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura A. (B) *Contour plot* com a porcentagem de células CD3^{+}/ CD8^{+} e (B1) número absoluto de células correspondentes à porcentagem duplo positiva da figura B. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Nos gráficos de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes (**P<0,01).

3.17 Avaliação da citotoxicidade de linfócitos T $CD8^+$

As células T CD8 citotóxicas têm papel importante no controle da PCM, sabendo disso, o perfil citotóxico dessas células foi investigado após 30 dias de infecção. Na figura 18A estão representados os controles utilizados para o ensaio, onde a primeira figura exibe BMDM-$CFSE^+PI^-$ indicando a viabilidade das células marcadas com CFSE; a segunda figura mostra células $CD3^+CD8^+CFSE^-PI^-$ indicando a ausência de marcação com CFSE e sua viabilidade; a terceira figura exibe o controle positivo de morte celular. Na Figura 18B está representada a purificação das células $CD3^+CD8^+$, exibindo o rendimento de 94,8%. Observamos que os BMDM apresentaram maior porcentagem de morte ($CFSE^+PI^+$) quando incubados com células $CD3^+CD8^+$ provenientes de animais $TLR3^{-/-}$ do que com células dos animais C57Bl/6 (Figura 18C). O mesmo resultado foi observado em relação ao número absoluto, onde as células $CD3^+CD8^+$ de animais $TLR3^{-/-}$ induziram aumento de morte em relação às células dos animais C57Bl/6 (Figura 18C1).

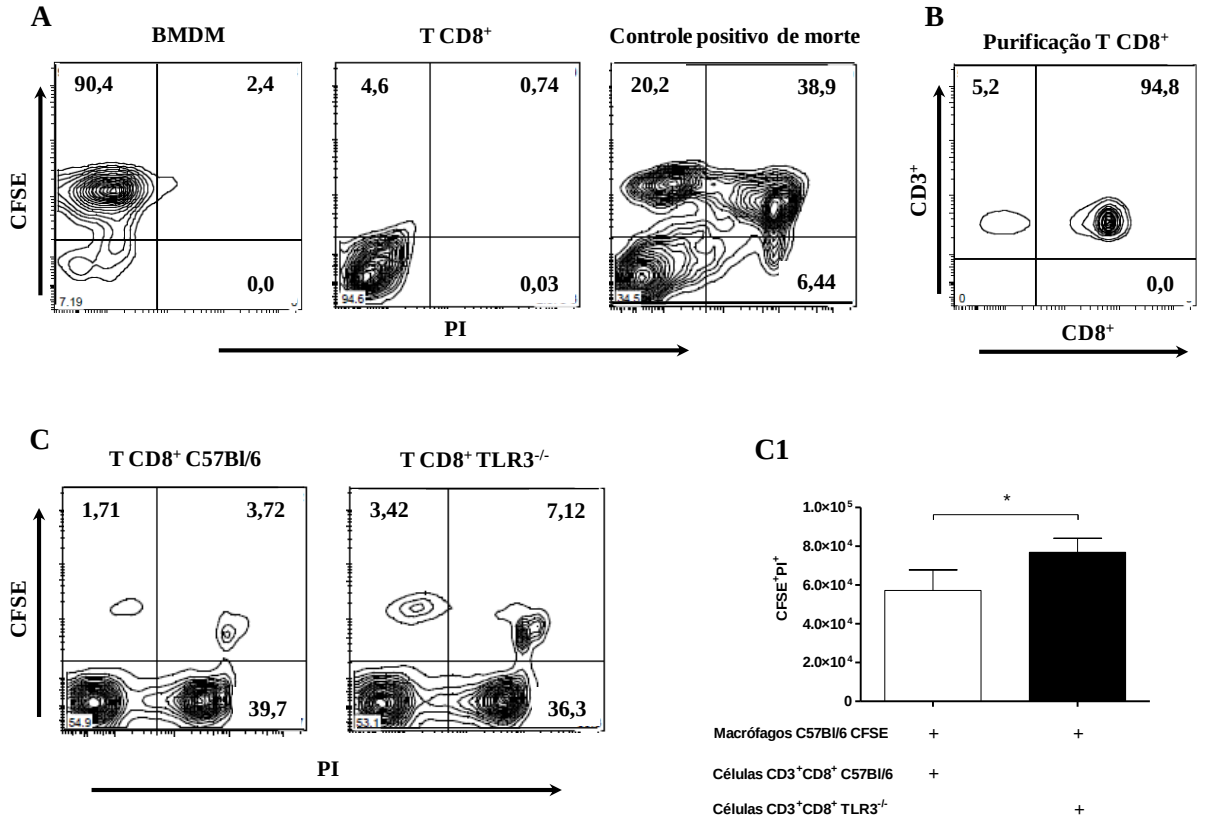

Figura 18. Linfócitos T CD8$^+$ tem maior atividade citotóxica na ausência de TLR3. BMDM de camundongos C57Bl/6 foram corados com CFSE e infectados com 1x10^5 leveduras da cepa Pb18 na proporção 1:1. Após 4 horas, células T CD8$^+$ purificadas do baço de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ (4 animais/grupo) foram adicionadas à cultura (5x10^5 células) e a citotoxicidade foi medida com PI por citometria de fluxo. (A) Controles de viabilidade de células para o ensaio, exibindo *Contour plot* de BMDM CFSE$^+$PI$^-$, de células T CD8$^+$ CFSE$^-$PI$^-$ e BMDM CFSE$^+$PI$^+$, as quais foram incubadas com água para controle positivo de morte. (B) *Contour plot* de BMDM incubados com células T CD8$^+$ de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ respectivamente. (B1) Gráfico de barras com o número absoluto de células CFSE$^+$PI$^+$. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes (*P<0,05).

3.18 Análise da expressão de granzimas e perforinas

As células CD3$^+$/CD8$^+$, utilizadas no ensaio de citotoxicidade, foram avaliadas quanto à capacidade de produção de granzimas e perforinas. Observamos que na ausência de TLR3 as células CD3$^+$/CD8$^+$ apresentam aumento de expressão gênica de *gzmb* e *prf1* em relação às células dos animais C57Bl/6 (Figura 19A e B respectivamente).

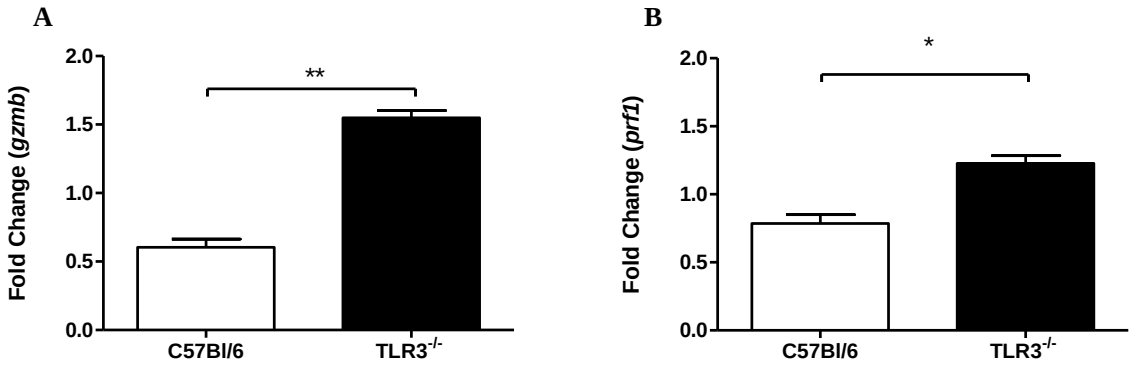

Figura 19. Linfócitos T CD8$^+$ tem maior expressão de *gzmb* e *prf1* na ausência de TLR3. As células T CD8$^+$ de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ utilizadas no ensaio de citotoxicidade, foram recolhidas para extração total de RNA e síntese de cDNA seguida da análise da expressão dos genes (A) granzima e (B) perforina por RT-PCR. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (*P<0,05 e **P<0,01).

3.19 Avaliação da viabilidade das leveduras da cepa Pb18

O sobrenadante do ensaio de citotoxicidade foi avaliado a fim de investigar seu potencial citotóxico em leveduras viáveis. As imagens de microscopia exibidas na figura A indicam que as leveduras apresentaram maior frequência de morte quando incubadas com o sobrenadante da interação com os linfócitos $TLR3^{-/-}$ do que com o sobrenadante dos linfócitos C57Bl/6. A porcentagem de morte foi apresentada em gráfico de barras (Figura 20A1), exibindo aumento citotóxico significativo quando utilizado o sobrenadante de $TLR3^{-/-}$. Os controles negativo e positivo de morte também foram exibidos na figura A.

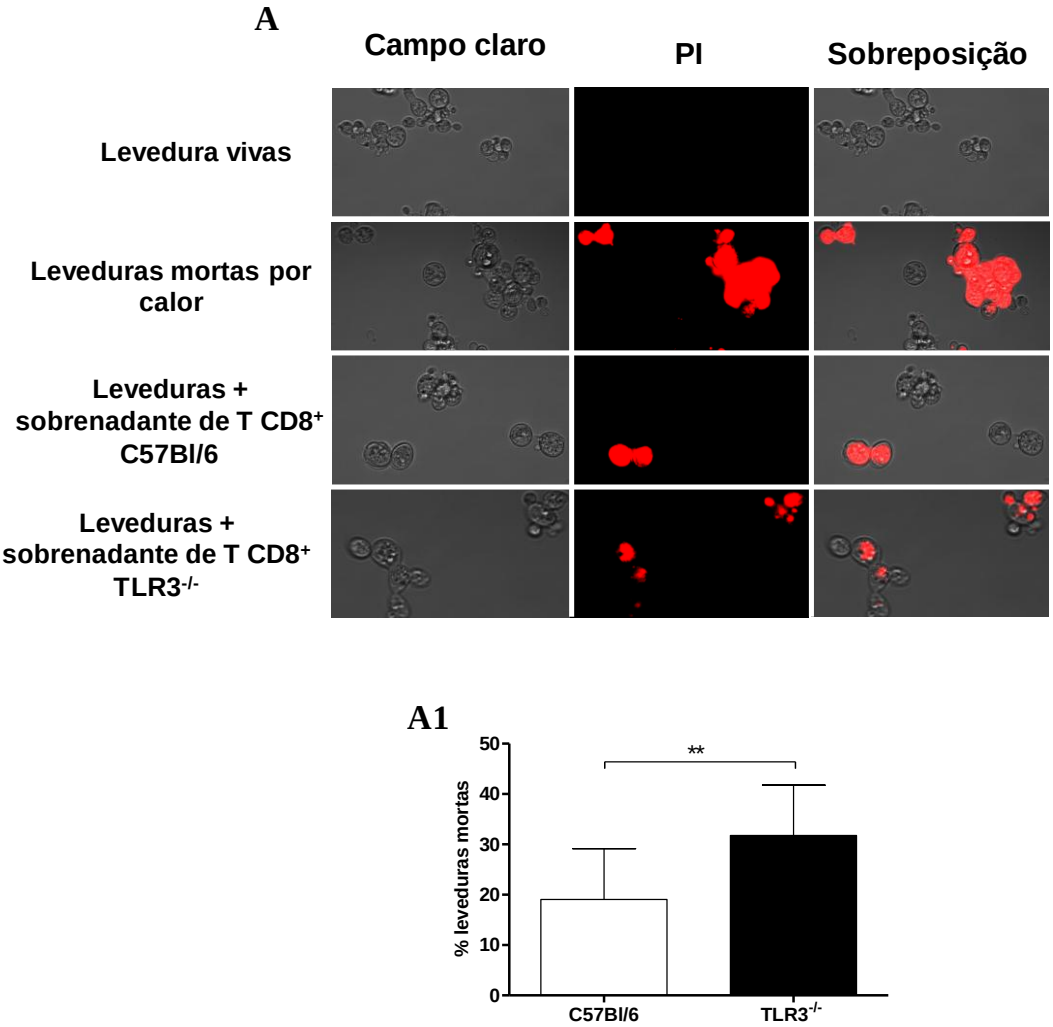

Figura 20Figura 20. Sobrenadante de linfócitos TLR3$^{-/-}$ induzem morte das leveduras. Foi utilizado o sobrenadante das interações BMDM com células T CD8^{+} C57Bl/6 ou TLR3$^{-/-}$ do ensaio de citotoxicidade, para incubação de leveduras da cepa Pb18 em condições viáveis *overnight*. Posteriormente as leveduras foram incubadas com PI para visualização de morte por microscopia de fluorescência. (A) Microscopia de fluorescência exibindo quadro de campo claro, marcação com PI e sobreposição dos quadros anteriores de leveduras em condições diferentes de incubação: apenas leveduras, leveduras mortas por calor, leveduras + sobrenadante da incubação com células T CD8^{+} C56Bl/6 e leveduras + sobrenadante da incubação com células T CD8^{+} TLR3$^{-/-}$. (A1) Gráfico de barras com a porcentagem de células PI^{+}. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (**P<0,01).

3.20 Avaliação da carga fúngica pulmonar após a depleção de células T CD8$^+$

Para investigar o papel protetor das células T CD8$^+$ na ausência de TLR3, foi realizado a depleção das células T CD8$^+$ em camundongos TLR3$^{-/-}$, por meio do tratamento com Mab Anti/CD8. A depleção foi de aproximadamente 98% (Figura 21A). Os grupos controles, camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$, foram tratados com IgG irrelevante. Em seguida, os grupos foram infectados e após 30 dias, os pulmões foram retirados para análises de UFC. Observamos que os camundongos TLR3$^{-/-}$-Anti/CD8 exibiram aumento significativo da carga fúngica pulmonar comparado aos camundongos TLR3$^{-/-}$ e nenhuma diferença de UFC foi observada em relação aos camundongos C57Bl/6 (Figura 21B).

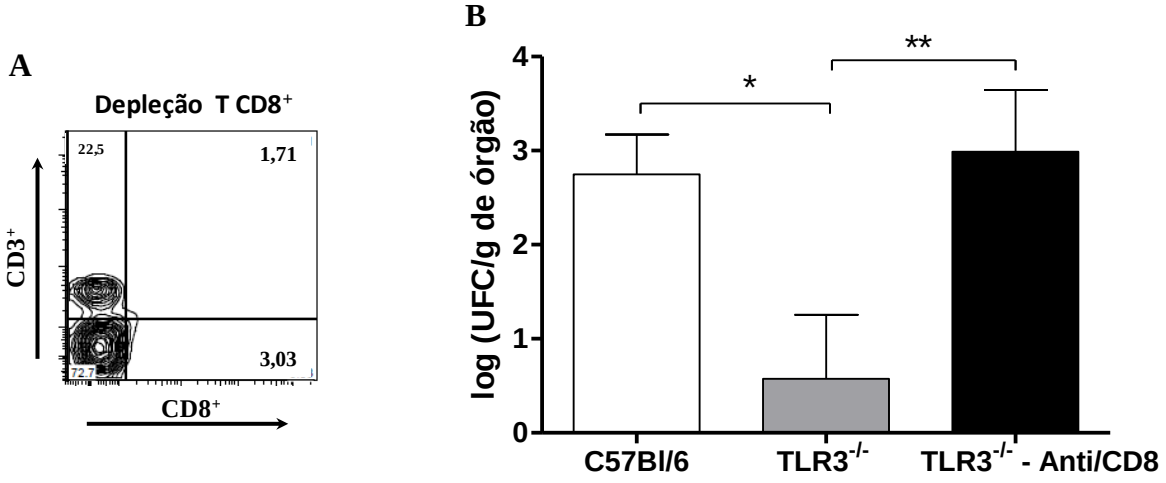

Figura 21. Células T CD8$^+$ conferem proteção à PCM na ausência de TLR3. A depleção de células T CD8$^+$ foi realizada em camundongos TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) por meio do tratamento com Mab anti-CD8. Como controle, camundongos C57BL/6 e TLR3$^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram trados com IgG irrelevante. Posteriormente ao tratamento, os camundongos foram infectados intratraquealmente com 1x10^6 leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias de infecção os animais foram eutanasiados e os pulmões obtidos para análise de unidades formadoras de colônia. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP (*P <0,05 e **P <0,01).

3.21 Perfil de citocinas pulmonares após a depleção de células T CD8+

Após o tratamento para depleção das células T $CD8^+$ e o tratamento nos grupos controles, os camundongos foram infectados e após 30 dias, os pulmões foram retirados, macerados e o sobrenadante utilizado para a dosagem das citocinas IFN-γ e IL-17. Observamos que os camundongos $TLR3^{-/-}$-Anti-CD8 apresentaram diminuição significativa tanto da produção de IFN-γ (Figura 22A), quanto da produção de IL-17 (Figura 22B) em relação aos camundongos $TLR3^{-/-}$, enquanto nenhuma diferença foi observada em relação aos camundongos C57Bl/6 (Figura 22A e B).

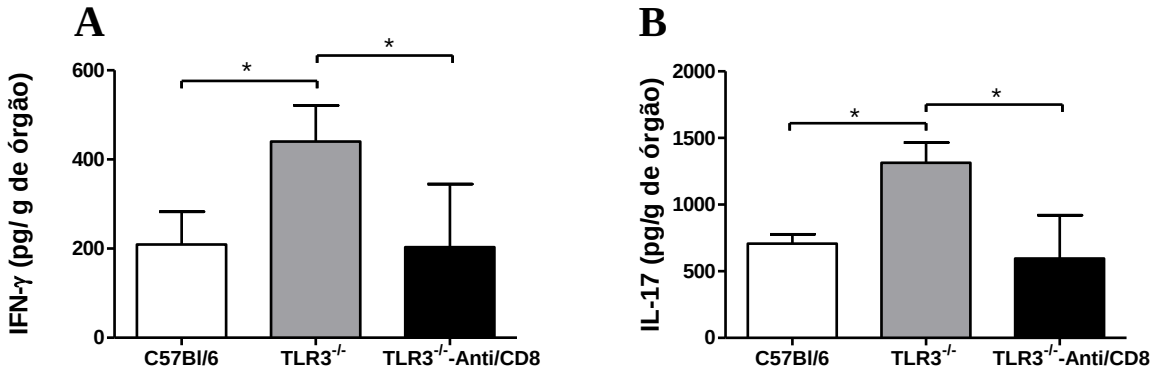

Figura 22. A depleção de células T $CD8^+$ promove diminuição de citocinas Th1 e Th17. A depleção de células T $CD8^+$ foi realizada em camundongos $TLR3^{-/-}$ (7 animais/grupo) por meio do tratamento com Mab anti-CD8. Como controle, camundongos C57BL/6 e $TLR3^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram trados com IgG irrelevante. Seguido do tratamento, os camundongos foram infectados intratraquealmente com $1x10^6$ leveduras da cepa Pb18. Após 30 dias de infecção os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, macerados e o sobrenadante utilizado para a dosagem das citocinas (A) IFN-γ e (B) IL-17. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (*P <0,05).

3.22 Análise do recrutamento de neutrófilos pulmonares

O recrutamento de neutrófilos foi investigado após 1, 3, 5 e 15 dias de infecção. As células $GR1^+/CD11b^+$ dos animais C57Bl/6 apresentaram maior porcentagem no 1° dia de infecção, em relação aos animais $TLR3^{-/-}$. Tal porcentagem sofreu diminuição no 3° dia e se manteve em níveis semelhantes até o 15° dia. Nos animais $TLR3^{-/-}$, as células $GR1^+/CD11b^+$ apresentaram aumento significativo de porcentagem no 3° dia, em relação ao recrutamento dos animais C57Bl/6, voltando a diminuir no 5° dia e mantendo-se em níveis semelhante até o 15° dia. (Figura 23A). Em números absolutos, observamos aumento significativo do recrutamento dessas células após 3 e 5 dias de infecção nos animais $TLR3^{-/-}$ (Figura 23B).

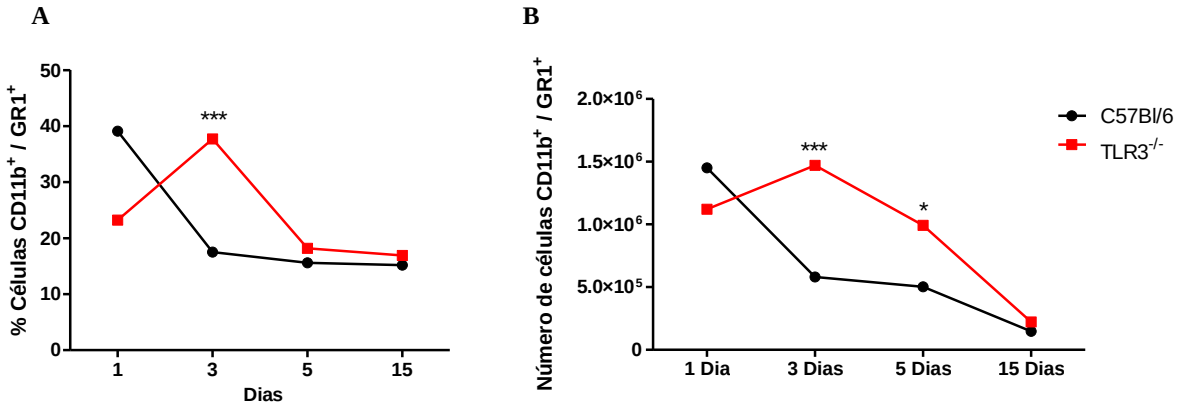

Figura 23. Camundongos $TLR3^{-/-}$ tem aumento no recrutamento de neutrófilos. Camundongos C57Bl/6 ou $TLR3^{-/-}$ (7 animais/grupo) foram infectados intratraquealmente com $1x10^6$ leveduras da cepa Pb18. Após 1, 3, 5 e 15 dias as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com anti-CD11b e anti-GR1. (A) Média da porcentagem de células $CD11b^+/GR1^+$. (B) Média do número absoluto de células correspondentes à porcentagem da figura A. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes (*P<0,05 e ***P<0,0001).

3.23 Fagocitose de BMDM

A capacidade fagocítica de BMDM foi avaliada após 4 horas de incubação com leveduras da cepa Pb18. Não observamos diferença entre as linhagens C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$. As figuras A e B exibem imagem dos BMDMs, proveniente dos animais C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ respectivamente, fagocitando leveduras de forma semelhante entre as linhagens. A figura C apresenta o índice fagocítico representado por gráfico de barras.

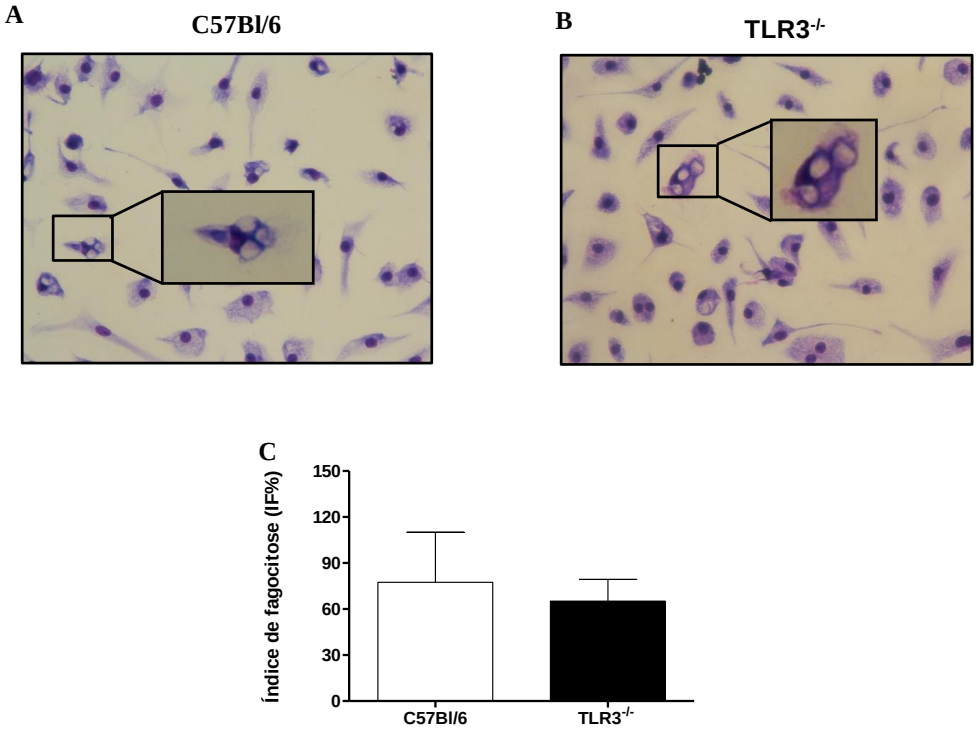

Figura 24. Fagocitose por BMDM não é alterada na ausência de TLR3. BMDM de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ ($2x10^5$ células) foram cultivados com $2x10^5$ de leveduras da cepa Pb18 por 4 horas para análise de fagocitose. (A e B) Imagens de BMDM de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$, respectivamente, fagocitando leveduras. (C) Índice de fagocítico representado em gráfico de barras. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

3.24 Análise de UFC de BMDM

No intuito de avaliar a capacidade fungicida de BMDM, o UFC foi avaliado após 4, 12 e 24 horas. Observamos que BMDM dos animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram diminuição significativa do UFC em 4 horas, quando comparado às células dos animais C57Bl/6 (Figura 25A). Após 12 e 24 horas ambas as linhagens exibiram UFC semelhantes (Figura B e C respectivamente).

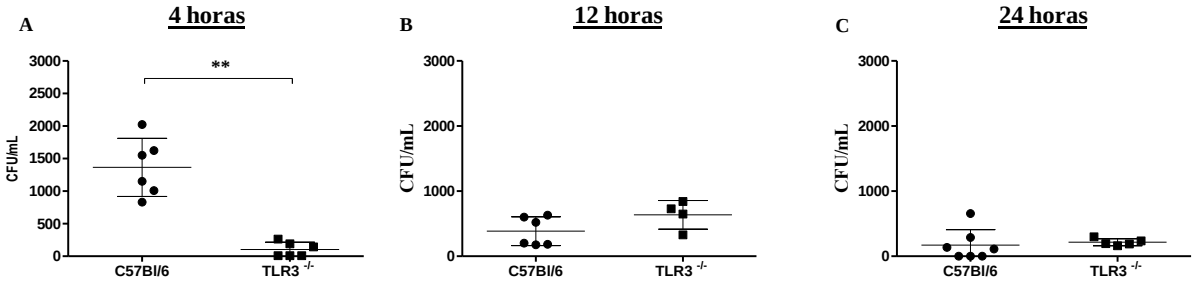

Figura 25. BMDM TLR3$^{-/-}$ tem sua capacidade fungicida aumentada em 4 horas. BMDM de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram ajustados (2x10^5 células) e interagidos com a cepa Pb18 (1:1) em diferentes horários. (A) UFC de 4 horas de incubação. (B) UFC de 12 horas de incubação. (C) UFC de 24 horas de interação entre essas células e leveduras de Pb18. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes (* P<0,05 e ** P <0.01).

3.25 Produção de oxido nítrico por BMDM

A Produção de NO foi analisada após 4 horas de interação dos BMDM com as leveduras da cepa Pb18. Observamos que os BMDM dos animais TLR3$^{-/-}$ tiveram aumento significativo na produção de NO em relação às células dos animais C57Bl/6 e o mesmo foi observado quando ativamos, previamente, as células com IFN-γ (Figura 26).

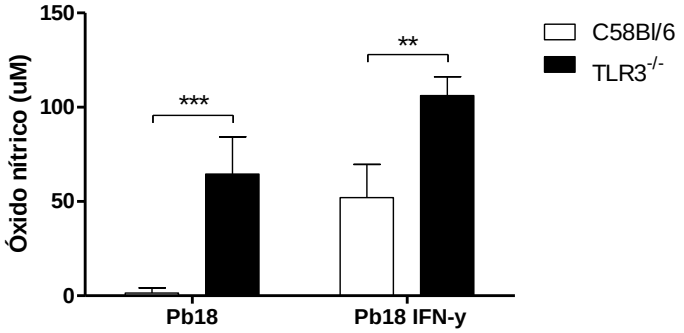

Figura 26. BMDM TLR3$^{-/-}$ tem aumento de produção de NO. BMDM foram ajustados (2x10^5 células), cultivados com adição ou não de IFN-γ (10 ng/mL) e incubados com a cepa Pb18 (1:1) por 4 horas. O sobrenadante das incubações foi obtido para dosagem de NO. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP. (**P<0,01 e ***P <0,0001).

3.26 Expressão de moléculas coestimulatórias

A expressão das moléculas coestimulatórias foi avaliada após 24 horas de interação de BMDM com leveduras da cepa PB18. Observamos que os BMDM de animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram diminuição significativa da expressão das moléculas CD80, CD40 e MHC-II em relação às células dos animais C57Bl/6. Nenhuma diferença foi observada na expressão das moléculas CD86 e MHC-I entre as linhagens.

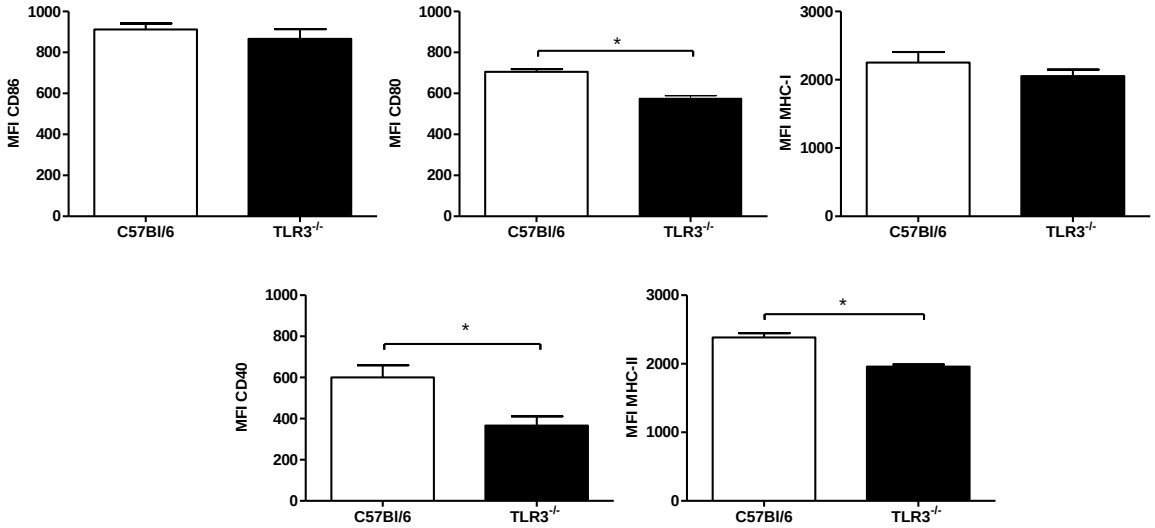

Figura 27. Diminuição da expressão de CD80, CD40 e MHC-II é observada em BMDM TLR3$^{-/-}$. BMDM de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram ajustados (2x10^5 células) e interagidos com a cepa Pb18 (1:1) por 24 horas. As células foram marcadas com anticorpos para CD86, CD80, CD40, MHC-I e MHC-II. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisados pelo software FlowJo. Foram adquiridos 100.000 eventos. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP (* P<0,05).

3.27 Análise da expressão gênica de BMDM

A expressão de genes relacionados com a resposta inata foi analisada após 4 horas de interação dos BMDM com leveduras da cepa P18. Dentre os genes investigados, não observamos diferença significativa de expressão entre as linhagens (Figura 28).

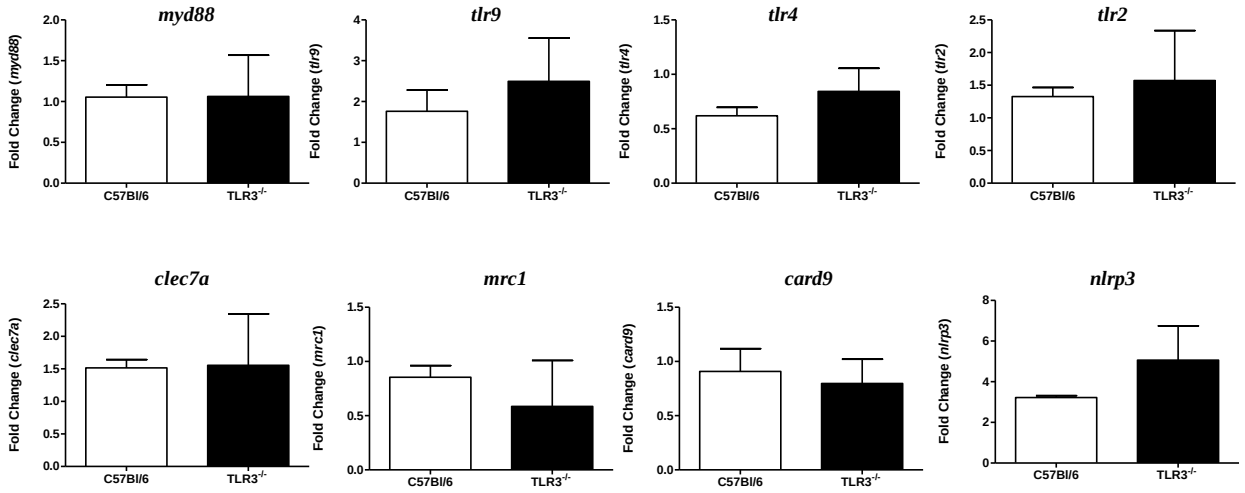

Figura 28. A ausência de TLR3 não altera a expressão dos genes *myd88, tlr9, tlr4, tlr2, clec7a, mrc1, card9* e *nlrp3* em BMDM. BMDM de camundongos C57Bl/6 e TLR3$^{-/-}$ foram ajustados (1x10^{6} células) e interagidos com a cepa Pb18 (1:1) por 4 horas. O RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado para análise da expressão dos genes de resposta inata *(myd88, tlr9, tlr4, tlr2, clec7a, mrc1, card9* e *nlrp3*) por PCR-Array. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. No gráfico de barra, cada barra representa a média + DP.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o papel do TLR3 tornou-se alvo de investigação em diferentes infecções fúngicas, mostrando que sua participação interfere diretamente na resposta imunológica frente ao patógeno fúngico, tanto em camundongos quanto em humanos. Müller e colaboradores (2007) utilizando células epiteliais infectadas com *C. albicans*, demonstraram que TLR3 induz uma resposta pró-inflamatória e exerce papel funcional na resposta do hospedeiro. Na aspergilose invasiva experimental, estudo sobre a atividade imunomodulatória do antifúngico micafungina demonstrou que sua eficácia terapêutica requer a contribuição da sinalização via TLR2/dectina-1 e TLR3/TRIF (MORETTI et al., 2013). Ainda em modelo de aspergilose, camundongos TLR3$^{-/-}$, infectados com conídios de *A. fumigatus*, apresentaram aumento do UFC pulmonar e maior incidência de disseminação para o cérebro, quando comparado com camundongos controles (CARVALHO et al., 2010). Em contrapartida, nossos resultados demonstram que a ausência de TLR3 promove redução significativa da carga fúngica pulmonar na infecção por *P. brasiliensis*. Estes dados indicam que o TLR3 pode desempenhar diferentes papéis dependendo da infecção fúngica estudada. Na PCM sua ausência está relacionada com o controle da doença.

Ao investigarmos se a ausência de TLR3 poderia apresentar diferentes perfis de populações celulares no pulmão, observamos aumento significativo de células T CD8^{+} em relação ao C57Bl/6. Tais células são de grande importância no controle da PCM, visto que sua ausência está fortemente relacionada com o aumento da gravidade da doença e disseminação do fungo para outros órgãos (CANO et al., 2000). Observamos também diminuição de células T CD4^{+} e neutrófilos, enquanto a presença de DCs se manteve semelhante entre as linhagens de camundongos. A diminuição de alguns perfis celulares nos animais TLR3$^{-/-}$ pode estar relacionada ao controle da PCM, apresentando diminuição do infiltrado inflamatório pulmonar.

Em infecções fúngicas, a polarização predominante de uma resposta Th1 está associada à imunidade protetora (DE OLIVEIRA et al., 2008; ROMANI, 2004). Na PCM, está bem estabelecido, tanto em modelos humano quanto em murino, que o controle da doença induz secreção de altos níveis de IFN-γ e IL-12 (padrão Th1), e que a diminuição destas citocinas e a prevalência de IL-10 e IL-4 (padrão Th2) está diretamente envolvida com a progressão da doença e sua disseminação (KASHINO et al., 2000; SOUTO, et al., 2000; BENARD et al., 2001; ARRUDA et al., 2004; ARRUDA et al., 2007). Embora não tenhamos

observado diferença na produção de IL-12 e IL-10 entre as linhagens, nossos resultados mostram que a ausência de TLR3 induz a produção de altos níveis de IFN-γ. Tal citocina, desempenha um papel importante na ativação da resposta imune celular, aumentando a atividade microbicida dos macrófagos e assim favorecendo a destruição das leveduras de *P. brasiliensis* (BERNARD et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; KASHINO et al., 2000; CALVI et al., 2003).

Ao analisarmos outras citocinas, foi possível observar aumento da produção de IL-17A e IL-6 nos animais TLR3$^{-/-}$, citocinas relacionadas ao padrão Th17 de resposta imunológica (LIANG et al., 2013; ZAMBRANO-ZARAGOZA, 2014). Tristão e colaboradores (2017) demonstraram que o processo de formação de granuloma, em animais infectados por *P. brasiliensis*, requer um perfil pulmonar de reposta Th17, com a produção de IL-17A, IL-6 e IL-23, onde a formação do granuloma foi associada à proteção da doença. Em lesões de pacientes com PCM, a presença de IL-17A foi relacionada ao aumento da resposta de defesa contra o fungo (PAGLIARI et al., 2011; DE CASTRO et al., 2013). Já, em modelos experimentais da PCM, animais deficientes de TLR2 desenvolveram imunidade prevalente Th17 promovendo controle fúngico pulmonar (LOURES et al., 2009), ao contrário dos animais TLR4$^{-/-}$, que desenvolveram uma ineficiente resposta contra o fungo, com diminuição de linfócitos Th17 e aumento da diferenciação de células Treg (LOURES et al., 2010). Esses estudos exibem que a resposta Th17 é importante no controle da PCM. No entanto, na infecção pulmonar por *A. fumigatus* o aumento a gravidade da doença, nos animais TLR3 $^{-/-}$, foi acompanhada pela diminuição da expressão de IFN-γ e aumento da expressão de IL-17A (CARVALHO et al., 2012).

Já está bem estabelecido que a citocina IL-1β contribui para a indução da resposta imune adaptativa, com participação na proliferação de células T, bem como na polarização para imunidade Th1. Em combinação com IL-6 e TGF-β, a IL-1β participa no direcionamento da polarização Th17 e na manutenção do perfil de produção de citocinas, tanto em murino quanto em humano (MISHRA et al., 2016; BEN-SASSON et al., 2009; BEN-SASSON et al., 2009; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; DE CASTRO et al., 2003; SHOHAM et al., 2001). Recentemente, Feriotti e colaboradores (2017), mostraram que a diminuição de IL-1β e IL-18, em animais NLRP3$^{-/-}$, exerceu profunda influência na polarização da resposta adaptativa na infecção por *P. brasiliensis*. Nossos resultados corroboram com estes estudos. Observamos que animais os TLR3$^{-/-}$ exibiram aumento de produção de IL-1β e IL-6 nos

pulmões e acreditamos que esse aumento possa estar relacionado com o padrão Th1/Th17 encontrado nesses animais.

Subtipos de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ regulam mecanismos efetores da resposta imune por meio da produção de distintos padrões de citocinas (MOSMANN, et al., 1991; CANO, et al., 1998; CALICH, et al., 2008). Dessa forma, para confirmar o padrão imunológico Th1/Th17, nós caracterizamos os subtipos de células Th por meio da investigação de citocinas intracelulares no curso da infecção por *P. brasiliensis*. Observamos que os animais $TLR3^{-/-}$ apresentaram maior número de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ, embora o número absoluto de células T $CD4^+$ seja maior nos animais C57Bl/6. Resultados semelhantes foram observados com a ativação de NLRP3 na infecção por *P. brasiliensis*, onde o aumento de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ foi relacionado com o controle da doença (FERIOTTI et al., 2017). Em modelo de resistência à PCM, animais A/J desenvolveram resposta protetora de células T $CD8^+$, as quais sintetizaram grande quantidade de IFN-γ (CHIARELLA, et al., 2007; CALICH, et al., 2005; CANO, et al., 2000). No entanto, animais deficientes de Indoleamine 2,3 dioxygenase-1 (IDO1), enzima que participa do metabolismo do triptofano e inibe a proliferação de células T antígeno-específicas, exibiram diminuição de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ, a qual foi relacionada ao perfil suscetível à PCM (HWAND et al., 2005; DE ARAÚJO et al., 2017).

Nossos resultados também mostraram que a ausência de TLR3 induziu aumento das populações de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IL-17. Resultado semelhante foi observado em modelo de aspergilose, onde a ausência de TLR3 induziu maior expansão de células Th17 produtoras de IL-17A, no entanto, esse achado foi relacionado com a susceptibilidade da aspergilose (CARVALHO et al., 2012). O controle da PCM, induzido em animais $TLR2^{-/-}$, foi acompanhado pelo aumento de células T $CD4^+$ produtoras de IL-17 enquanto nenhuma alteração foi observada no número de células T $CD8^+$ produtoras de IL-17 (LOURES et al., 2009). Além disso, a ativação de NLRP3 induziu aumento da expansão de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IL-17, que também contribui para o mecanismo de controle da PCM (FERIOTTI et al., 2017). Já susceptibilidade da PCM, a ausência de dectina-1foi relacionada com a diminuição da expansão de células T $CD8^+$ produtoras de IL-17 e, em animais $TLR4^{-/-}$ foi relacionada com a diminuição de ambas as células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IL-17 (LOURES et al., 2014; LOURES et al., 2015). Dessa forma, sugerimos que nossos resultados demonstram que a ausência de TLR3 promove resposta protetora na PCM. Esta proteção esta relacionada com o padrão de resposta Th1 e Th17 direcionado pelas

células T $CD4^+$ e $CD8^+$. Além disso, a capacidade linfoproliferativa em camundongos $TLR3^{-/-}$ apresentou aumento em relação aos camundongos controle e esses dados reforçam a ideia de que a ausência de TLR3 induz uma resposta de células T efetora mais eficiente, contribuindo como controle da infecção.

A seguir caracterizamos a presença de células T regulatórias (Treg) no pulmão dos animais. As células Treg são uma subpopulação de células T $CD4^+$ as quais regulam a ativação de células do sistema imune que mantém a tolerância periférica para autoantígenos (BURZYN et al., 2013). Essas células expressam uma variedade de marcadores fenotípicos, sendo os principais deles o CD4, CD25 e FoxP3. O FoxP3 é considerado o principal marcador das células Treg e tem um importante papel na diferenciação e atividade supressora para essas células (GAVIN et al., 2007).

O papel das células Treg é controverso entre alguns estudos, enquanto uns mostram que essas células podem dificultar a resposta imune do hospedeiro, outros estudos sugerem que sua presença é benéfica e que diminui o dano tecidual que frequentemente ocorre na resposta imune (MILLS, 2004; PAGLIARI et al, 2011). Na PCM, grande parte dos estudos sugere que o aumento de células Treg esta associado à gravidade da doença. A transferência de células Treg de camundongos WT para camundongos deficientes de Treg aumentou significativamente o número de leveduras viáveis no pulmão desses animais (MOREIRA et al, 2008). Em adição, camundongos WT tratados com anti-CD25 (diminuiu significativamente o número de células Treg) apresentaram redução da carga fúngica pulmonar, sugerindo que essas células favorecem o crescimento do fungo (FENOLATO et al., 2012). Em animais $TLR2^{-/-}$, o controle da PCM foi associado com a diminuição das células Treg, enquanto animais $TLR4^{-/-}$ mostraram que a susceptibilidade para a doença foi relacionada com o aumento dessas células (LOURES et al., 2009; LOURES et al., 2010). Contudo, nossos dados mostraram que o controle da infecção por *P. brasiliensis* em camundongos $TLR3^{-/-}$ foi acompanhado pelo aumento de células Treg no pulmão. Interessantemente, Fenolato e colaboradores (2012) mostraram que camundongos resistentes (A/J), infectados ou não, apresentaram maiores números de células Treg que os susceptíveis (B10a). Dessa forma, o aumento das células Treg na ausência de TLR3 parece ajudar a proporcionar um equilíbrio na resposta imune, lembrando que o aumento dessas células foi observado quando o número de células T $CD4^+$ estava diminuído e a infecção controlada.

Ao analisarmos as células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ nos linfonodos regionais, observamos que nos animais $TLR3^{-/-}$ ambos os linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ se apresentaram em números

reduzidos em relação ao C57Bl/6, embora o perfil Th1 e Th17 de citocinas estivessem mais acentuados. Acreditamos que a diminuição dessas células T junto com o padrão de citocinas mostrado possa estar relacionada com o seu recrutamento para o pulmão, uma vez que foi visto aumento no pulmão de células T $CD4^+$ e $TCD8^+$ produtoras de ambas as citocinas IFN-γ e IL17.

Kashino e colaboradores (2000), mostraram que a resistência a PCM está relacionado a níveis elevados de citocinas de padrão Th1 e com altos títulos de IgG2a, enquanto a suscetibilidade, com uma resposta imunológica prevalente de citocinas de padrão Th2 e altos títulos de IgG2b e IgG1. Ao analisarmos o padrão de resposta humoral gerado, observamos que os animais $TLR3^{-/-}$ apresentaram maiores títulos de IgG1 frente aos C57Bl/6 e que os títulos de IgG2a se mantiveram semelhantes entre as linhagens. Nossos resultados sugerem que apesar da ausência de TLR3 ter contribuído para um perfil humoral Th2, acredita-se que tal resposta não exerça papel fundamental no controle da doença, como visto por Elluru e colaboradores (2015) em um elegante trabalho sobre o papel protetor das imunoglobulinas em infecções fúngicas.

Após analisarmos o perfil de resposta induzido na ausência de TLR3, observamos que as células T $CD8^+$ se mostraram em maiores números durante todo o curso da infecção (15 e 30 dias de infecção). Este dado nos chamou muita atenção, uma vez que dentre os mecanismos de proteção à PCM envolvendo subtipos de células T, as células T $CD8^+$ tem grande contribuição e importância no controle da PCM (CANO et al., 2000; CHIRELLA et al., 2007). Chiarella e colaboradores (2007), ao depletarem linfócitos T $CD8^+$ observaram aumento da carga fúngica pulmonar tanto em animais resistentes quanto em animais susceptíveis para a PCM, evidenciando o importante papel dessas células na imunoproteção da PCM.

Baseado nesses estudos, nós investigamos a contribuição das células T $CD8^+$ no controle da infecção em modelo de ausência de TLR3. Ao avaliamos o perfil citotóxico dessas células, observamos que os linfócitos T $CD8^+$ de camundongos $TLR3^{-/-}$ exerceram maior atividade citotóxica nos macrófagos que os linfócitos do grupo C57Bl/6. Como o papel citotóxico das células T CD8 efetoras baseia-se na produção de granzimas e perforinas, que atuam destruindo células infectadas a fim de controlar o processo infeccioso (WHERRY et al., 2003), ao investigarmos a expressão desses genes, observamos que os linfócitos T $CD8^+$ $TLR3^{-/-}$ apresentavam maior expressão tanto dos genes de granzima quanto de perforina, em relação aos linfócitos dos animais C57Bl/6, evidenciando um potencial citotóxico mais

efetivo. Posteriormente, avaliamos se o sobrenadante do ensaio de citotoxicidade teria propriedades fungicidas suficientes para matar leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Identificamos que o sobrenadante proveniente da interação com os linfócitos T $CD8^+$ $TLR3^{-/-}$ mostraram ser mais tóxicos que o do grupo controle. Dessa forma, sugerimos que a ausência de TLR3 promove aumento da capacidade citotóxica dos linfócitos T $CD8^+$ gerando um ambiente mais microbicida, prevenindo que as leveduras que escaparem dos fagócitos consigam sobreviver e continuar a infecção.

Para confirmar o mecanismo de proteção supostamente induzido pelas células T $CD8^+$ na ausência de TLR3, nós realizamos a depleção dos linfócitos T $CD8^+$ nos camundongos $TLR3^{-/-}$ e notamos que esses animais tiveram aumento de carga fúngica pulmonar, se assemelhando ao UFC exibido pelos animais C57Bl/6. Os camundongos $TLR3^{-/-}$ (sem a depleção) mantiveram quantidades significativamente inferiores de UFC que ambos os grupos C57Bl/6 e $TLR3^{-/-}$ tratados com Anti-CD8. Além disso, a depleção das células T $CD8^+$ diminuiu significativamente a produção de IFN-γ e IL-17 quando comparado aos animais $TLR3^{-/-}$ sem tratamento. Os níveis de produção de ambas as citocinas foram semelhantes entre os grupos $TLR3^{-/-}$ - Anti/CD8 e o grupo C57Bl/6. Com esses resultados, sugerimos que a proteção conferida à PCM na ausência de TLR3 é mediada por células T $CD8^+$ citotóxicas e apresenta padrão de resposta Th1/Th17.

Como a resposta imunológica é complexa e sabemos que diversas células participam de um processo infeccioso, fomos investigar a participação de células importantes também na resposta inata.

Diversos estudos vêm relacionando o recrutamento de neutrófilos para os sítios inflamatórios com o direcionamento da resposta Th17 (LEY et al., 2006; WU et al., 2007; LIANG et al., 2007). A associação da produção de IL-17 e o recrutamento de PMN (polimorfonucleares) para o local infeccioso vêm sendo relacionados em diversos tipos de infecções, como na pneumonia bacteriana (YE et al., 2001), em infecções pulmonares crônicas (LINDEN et al., 2005) e em algumas infecções fúngicas (COOPER et al., 2007; ZELANTE et al., 2007). Outros trabalhos apontam as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1β como indutoras do influxo de PMN. A produção de IL-6 e IL-1β já foram relacionadas com o recrutamento de PMN em modelos de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *Pneumocystis carinii* (KULLBERG et al., 1999; NETEA et al., 1999; SCHELENZ et al., 1999; CHEN et al., 1992). Gonzales e colaboradores (2003) mostraram que nos estágios iniciais da infecção com conídios de *P. brasiliensis*, os animais exibiram aumento significativo de TNF-α, IL-6 e IL-

1β e aumento no recrutamento de leucócitos nos pulmões. A IL-6 é uma citocina inflamatória que controla o recrutamento de leucócitos, ativação e apoptose, enquanto que IL-1β, juntamente com TNF-α, medeiam às respostas inflamatórias locais e sistêmicas (DINARELLO et al., 1989; TRACEY et al., 1994; TRACEY et al., 1994). Em 2011 (LOPERA et al., 2011), foi demonstrado que após 4 horas de infecção, com conídios de *P. brasiliensis*, o pulmão dos camundongos exibiu aumento significativo de IL-6, IL-1β e um ligeiro infiltrado de macrófagos e neutrófilos.

Como observamos que os animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram aumento de IL-17, IL-6 e IL-1β após 30 dias de infecção e que, no entanto, esses animais exibiram diminuição de neutrófilos neste período, fomos investigar o recrutamento dessas células em períodos iniciais da infecção. Nossos resultados mostram que os animais TLR3$^{-/-}$ apresentaram aumento significativo de influxo de neutrófilo nos pulmões no 3° e 5° dia de infecção.

A ativação da resposta imune adaptativa depende de eventos inatos iniciais que ocorrem durante a infecção pelo patógeno. Tais eventos são iniciados por células responsáveis em reconhecer e responder a invasão do patógeno, tal como as células fagocíticas (HOEBE et al., 2004). Na PCM, os fagócitos têm importante papel na defesa do hospedeiro, visto que *P. brasiliensis* é um microrganismo intracelular facultativo (RESTREPO-MORENO 1993; CALVI et al., 2003).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na regulação do crescimento fúngico em estágios iniciais da infecção (CALICH et al., 1998; DE SOUZA et al., 2015). Considerando a patogênese da PCM, os estágios iniciais são extremamente importantes, principalmente quando macrófagos residentes do pulmão interagem com o fungo pela primeira vez e tornam-se ativados (SOARES et al., 2010). Tem sido demonstrado que *P. brasiliensis* é fagocitado por macrófagos e que tais células apresentam efeitos fungicidas contribuindo para sua eliminação (POPI et al., 2002). Calvi e colaboradores (2003) ao instigarem a resposta de macrófagos humanos frente a leveduras de *P. brasiliensis* observaram que tais macrófagos, tratados com IFN-γ recombinante ou com citocinas de sobrenadante de células mononucleares estimuladas com concanavalina A, diminuíram a replicação do fungo, mas perderam a atividade fungicida. Nós demonstramos nas primeiras 4 horas de interação, que apesar de não haver diferença na fagocitose, os BMDMs TLR3$^{-/-}$ apresentam maior capacidade fungicida que os BMDMs dos animais C57Bl/6, e esse aumento foi acompanhado de maior produção de NO. Vale ressaltar que ao adicionarmos IFN-γ nas

culturas, a produção de NO aumentou em ambas as linhagens, conforme o esperado, e a diferença no perfil de produção se mantiveram.

Durante a infecção, a produção de NO é uma das estratégias de defesa utilizadas pelos macrófagos, a qual confere a ele função fungicida (GONZALEZ et al., 2003; CANO et al., 1994; BRUMMER et al., 1988 e BRUMMER et al., 1989). O papel do NO tem interpretações diferentes na literatura, mostrando que ele pode exercer efeitos positivos e negativos na regulação do hospedeiro (EISENSTEIN, 2001; CONNELLY et al., 2001). Foi visto, em animais susceptíveis à PCM, que a produção de NO controla a multiplicação fúngica, mas que em algum momento ela inibe a produção de TNF-α, a qual é essencial para o controle da disseminação (SOUTO et al., 2000). Entretanto, outros trabalhos mostram que a ausência de iNOS (oxido nítrico sintetase induzida) induz aumento da carga fúngica na infecção por *P. brasiliensis*, sugerindo que NO tem um papel importante no controle da infecção (PARENTE et al., 2015; BERNADINO et al., 2013). Em síntese, nossos dados indicam que a produção de NO na ausência de TLR3 confere aos macrófagos perfil microbicida no início da infecção.

Hoje sabemos que o contato entre patógenos e células do hospedeiro pode envolver múltiplos PAMPs e seus cognatos PRRs, e que a interação entre esses receptores direcionam resposta específicas para cada patógeno (TRINCHIERI & SHER, 2007). A interação entre o ligante e o receptor leva a ativação de uma cascata sinalização intrínseca nas células, induzindo a produção de quimiocinas e citocinas que irão atuar no recrutamento e ativação de células do sistema imune inato e adaptativo (WHITSETT & ALENGHAT, 2015). Nos macrófagos, a sinalização resultante da interação entre dectina-1 e TLR2 mostrou-se necessária para a indução de TNF-α, IL-10, IL-6 e IL-23 em resposta a infecções fúngicas (BROWN et al., 2006; DENNEHY et al., 2008; FERWERDA et al., 2008). Em nosso trabalho não visualizamos diferença significativa na expressão dos genes *tlr2, tlr4, clec7a, mrc1, card9, nlrp3 e myd88*, no período determinado para analise, e também nenhuma produção de citocina foi detectada (dados não mostrados). No entanto, diferenças na expressão de moléculas coestimulatórias foram observadas. Na ausência de TLR3, os BMDM apresentaram diminuição de CD80, CD40 e MHC-II, moléculas importantes para ativação de células T. Tem sido descrito que a infecção por *P. brasiliensis* prejudica a expressão de MHC-II e que macrófagos de animais susceptíveis são menos efetivos na apresentação de antígeno (BOCCA et al., 1999; ALMEIDA et al., 2001). No entanto, Nascimento e colaboradores (2002) exibiram que macrófagos peritoneais de animais susceptíveis tem maior expressão de MHC-II que os macrófagos de animais resistentes, no entanto, o grupo justifica que a

discrepância entre seu resultado e os resultados descritos anteriormente poderia ser devido a diferentes protocolos utilizados para obtenção dessas células. Acreditamos que embora o fenótipo dos BMDMs TLR3$^{-/-}$ apresente um perfil pouco desenvolvido para apresentação de antígeno às células T, essas células possuem fortes características fungicidas que contribuem para o controle inicial da infecção.

Uma visão geral dos resultados que foram apresentados neste trabalho pode ser observada na Figura 29, onde mostra que a ausência de TLR3, na resposta inata, induz alta produção de NO pelos macrófagos e que, após a ativação da resposta adaptativa, a ausência de TLR3 exibe maior frequência de células T CD8^{+} citotóxicas produtoras de IFN-γ e IL-17 associadas a um perfil Th1/Th17 de resposta. Consequentemente, a alta produção de IFN-γ induz ainda mais o aumento da produção de NO pelos macrófagos, deixando-os ainda mais fungicidas. O conjunto desses eventos promove o controle da infecção por *P. brasiliensis*. Com o bloqueio das células T CD8^{+} a infecção confere caráter mais grave com diminuição do perfil Th1/ Th17 de resposta e, consequentemente, o aumento da carga fúngica pulmonar. Dessa forma, na ausência de TLR3 as células T CD8^{+} exercem papel fundamental no controle da infecção.

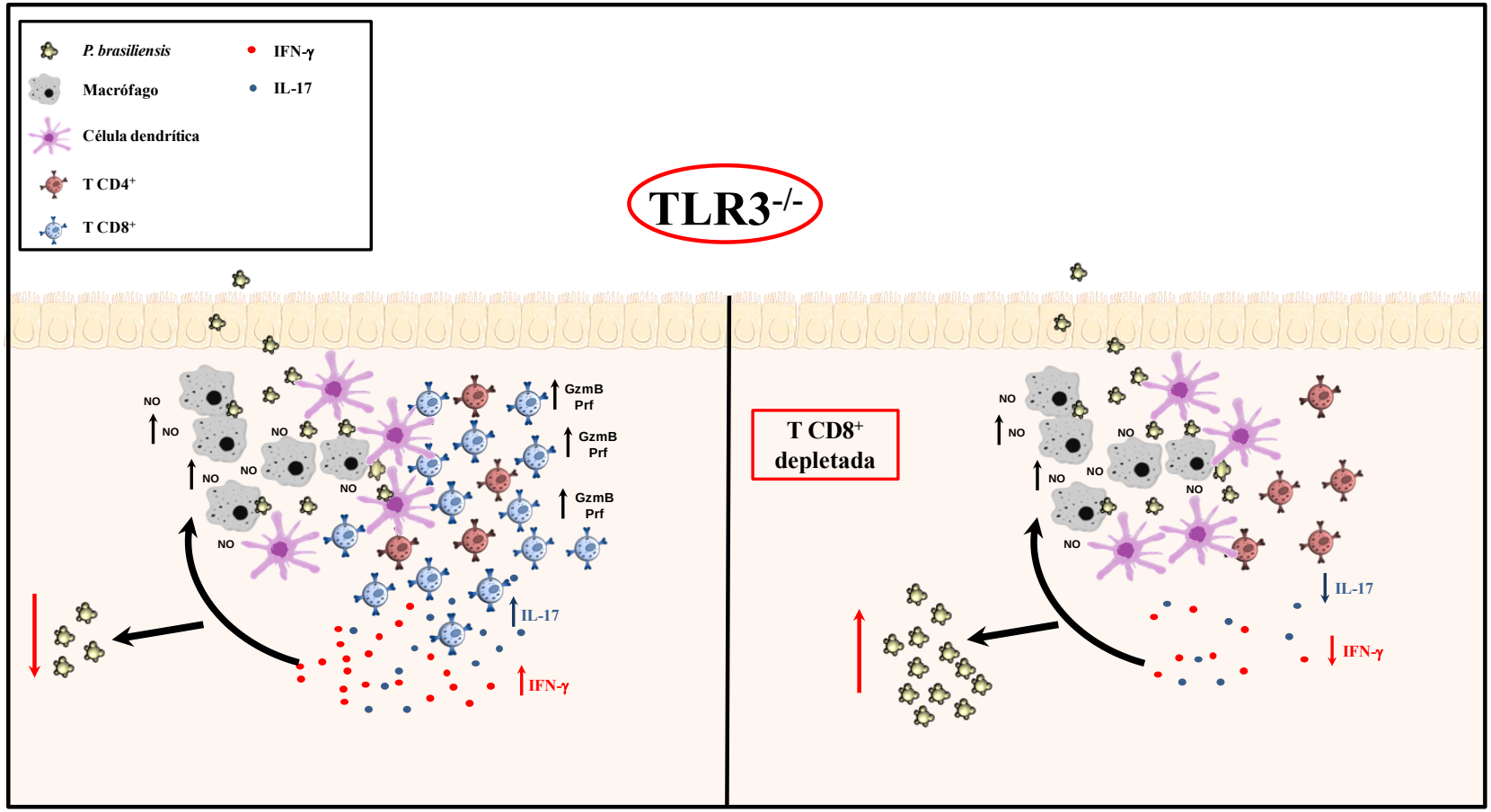

Figura 29. Panorama geral da participação do TLR3 na resposta da PCM experimental. Na ausência de TLR3, BMDM apresentaram maior produção de óxido nítrico ao serem incubados com leveduras de *P. brasiliensis* e tal produção foi ainda maior ao serem estimulados com IFN-γ *in vitro*. (Quadro a esquerda) Após a ativação da resposta adaptativa, *in vivo*, houve aumento da expansão de linfócitos TCD8$^+$ citotóxicos produtores de IFN-γ e IL-17 e aumento de ambas as citocinas no homogenato pulmonar, exibindo padrão Th1 e Th17 de resposta. (Quadro a direita) Foi utilizado Mab Anti-CD8 para a depleção das células T CD8$^+$. A ausência das células T CD8$^+$ citotóxicas promoveram diminuição de ambas as citocinas IFN-γ e IL-17 e aumento da carga fúngica pulmonar. Esses dados mostram que na ausência de TLR3 os linfócitos T CD8$^+$ exibem um importante papel no controle da PCM.

6. CONCLUSÕES

A ausência de TLR3:

- Promove o controle da infecção por *P. brasiliensis*;
- Estabelece resposta Th1 e Th17 pulmonar;
- Apresenta aumento da capacidade linfoproliferativa;
- Aumenta o número de células T $CD8^+$ durante o curso da doença;
- Apresenta células T $CD8^+$ com perfil mais citotóxico;
- O controle da infecção é mediado por células T $CD8^+$;
- Os BMDMs possuem perfil mais microbicida

Nossos resultados proporcionaram maior entendimento sobre as funções exercidas pelo TLR3 na infecção pelo *P. brasiliensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition in innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A.C; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. **Nature**;413(6857): 732–8, 2001.

ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. Fac. Med. Univ. São Paulo 1930, 5, 125–141.

ALMEIDA, S.M. **Central nervous paracoccidioidomycosis: na overview**. Braz. J. Infect. Dis. v. 9, p. 126-133, 2005.

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

ARRUDA, C.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CALICH, V. L. A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 308-316, 2007.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhaces pulmonary inflammation. **Clinical Immunol**. V. 103, p. 185-95, 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; FRANCO, M. F.; CALICH, V. L. G. Dual role of IL-4 in pumonary Paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induces pretection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. Infect. Immun. V. 72, p. 3932-40, 2004.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.; THEODORO, R.C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect. Genet. Evol**. 2006, 6, 344–351.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, SDE. M.; HEBELERBARBOSA, F.; TRINCA, L.A.; MONTENEGRO, M.R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol**. 2003, 41, 217–223.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol, v.18, p.767-811, 2000.

BARROZO, L.V.; BENARD, G.; SILVA, M.E.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S.A.; MENDES, R.P. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 2010, 4, e643.

BARROZO, L.V.; BENARD, G.; SILVA, M.E.S.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S.A.; MENDES R.P. First Description of a Cluster of Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis Cases and Its Association with a Climatic Anomaly. PloS One, V.4, e643, 2010.

BARROZO, L.V.; MENDES, R.D., MARQUES, S.A.;BENARD, G.; SILVA, M.F.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute PCM in a hyper-endemic area in Brazil. Int. J. Epidemiol. 38: 1642-9 2009.

BARROZO, L.V.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; BENARD, G.; SILVA, M.E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/ subacute paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. **Int. J. Epidemiol**. 2009, 38, 1642–1649.

BELL, J.K.; BOTOS, I.; HALL, P.R.; ASKINS, J.; SHILOACH, J.; DAVIES, D.R.; et al. The molecular structure of the TLR3 extracellular domain. J Endotoxin Res 2006;12(6):375–8.

BELLOCCHIO, S.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; MAMBULA, S. S.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; LEVITZ, S. M. and ROMANI, L. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. J. Immunol. 2004. 172:3059–3069.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine** 13(4):248e52, 2001.

BEUTLER BA. TLRs and innate immunity. **Blood** 2009, 113: 1399 – 1407

BIONDO, C., MIDIRI, A.; MESSINA, L.; TOMASELLO, F.; GARUFI, G.; CATANIA, M. R.; BOMBACI, M.; BENINATI, C.; TETI, G. and MANCUSO, G. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against Cryptococcus neoformans. Eur. J. Immunol. 2005, 35:870–878.

BONIFAZ, A. Micología média básica. McGraw Hill Interamericana Editores, 2010.

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

BOURGEOIS, C.; MAJER, O.; FROHNER, I. E.; TIERNEY, L.; KUCHLER, K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. **Curr. Opin. Microbiol.** v.**13**, 401–408, 2010.

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.

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.

BRITO, T.; FRANCO, M.F. **Granulomatous inflammation**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v.36 (2), p.185-92, 1994.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. **Paraoccidioidomycosis: an update**. Clin. Microbiol. Rev. v.6 (2), p.89-117, 1993.

BUITRAGO, M.J.; BERNAL-MARTÍNEZ, L., CASTELLI, M.V.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCAESTRELLA, M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. **J. Travel Med**. 2011, 18, 26–33.

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

CALICH, V. L. G.; BLOTTA, M. H. S. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In Fungal Immunology: From an Organ Perspective. **Springer, New York**. 201–228, 2005.

CALICH, V. L.; COSTA, T. A.; FELONATO, M.; ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia.** 165:223–36, 2008.

CALICH, V.L.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptibility and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v.31 (5), p. 615-23, 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. **Microb. Infect**. v. 5, p. 107-113, 2003.

CAMPANELLI, A. P.; MARTINS, G. A.; SOUTO, J. T.; PEREIRA, M. S.; LIVONESI, M. C.; MATINEZ, R.; SILVA, J. S. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediated T cell unresponsive in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Infect. Dis**. V. 187, p. 1496-1505, 2003.

CAMPOS, M. A. S.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCÓPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidyllinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, v. 167, p. 416-426, 2001.

CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E. P.; CARDOSO, J. E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differention factor 88. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1711-1718, 2004.

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. **Infec. Immun**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidi-oidomycosis. **Infect Immun.** 66:800–6, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; et al. Depletion of $CD8^+$ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**. 68: 352–359, 2000.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; COSTA, T.A.; MENGEL, J.O.; XIDIEH, C.F.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.C.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Depletion of CD8þ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis, Infect. Immun. 68 (2000) 352e359.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M; VAZ, C.A.C; RUSSO , R.; CALICH, V.L.G. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in Resistant and Susceptible Mice: Relationship among Progression of Infection, Bronchoalveolar Cell Activation, Cellular Immune Response, and Specific Isotype Patterns. Infect. Immun. 63 (1995) p.1777-1782.

CARVALHO, A., DE LUCA, A., BOZZA, S., CUNHA, C., D'ANGELO, C., MORETTI, S., PERRUCCIO, K., IANNITTI, R.G., FALLARINO, F., PIERINI, A., LATGÉ, J.P., VELARDI, A., AVERSA, F., ROMANI, L. TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory $CD8^+$ T-cell responses to Aspergillus fumigatus in hematopoietic transplanted patients.**Blood**. 26;119(4):967-77, 2012

CARVALHO, A. *et al.* Prognostic significance of genetic variants in the IL23/Th17 pathway for the outcome of T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **45**, 1645–1652 (2010).

CASTAÑEDA, E., BRUMER, E.; PERLMAN, A.M.; MCEVENS, J.; STEVENS, D.A. A culture medium for Paracoccidioides brasiliensis with high plating efficiency and the efct of siderophores. J. Med. Vet. Mycol. 26: 351-58, 1988.

CASTRO, L. F.; FERREIRA, M. C.; SILVA, M. R.; BLOTTA, M. H. S. L.; LONGHI, L. N. A.; R. L. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, 2013, 67, 470-485.

CAVASSANI, K.A.; ISHII, M.; WEN, H.; *et al*. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. J Exp Med 2008;205(11):2609-2621.

CHEN, W.; HAVELL, E. A.; MOLDAWER, L. L.; MCINTYRE, K. W.; CHIZZONITE,R. a.; HARMSEN, A. G. Interleukin-1: an important mediator of host resistance against *Pneumocystis canndi*. **J. Exp. Med**. 176:713-718, 1992..

CHEN, Z.; O'SHEA, J. J. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. **Immunol Res** 41(2):87–102, 2008.

CHIARELLA, A. P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T. A.; FERREIRA, R.C.; et al. The relative importance of CD4+ and $CD8^+$ T cell in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect** .9: 1078–1088, 2007.

COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PIZAN, C. F.; VENDRUSCULO, P. E.; MARTINEZ, R., GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM^+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis*infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am. J. Pathol.**, v. 173, p. 423-432, 2008.

CONTI-DIAZ, I.A.; RILLA, F.D. Hipotesis sobre el nicho ecologico del *P. brasiliensis*. **Rev. Med. Urug.** v.5. p.97. 1989.

CONZE, D.B.; WU, C.J.;THOMAS, J.A.; LANDSTROM, A.; ASHWELL, J.D. Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. **Mol Cell Biol**. 2008, 28: 3538 – 3547

CORREDOR, G.G.; CASTAÑO, J.H.; PERALTA, L.A.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypusnovemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol**. 1999, 16, 216–220.

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

COX RA, MAGEE DM. Production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, and interleukin-6 during murine coccidioidomycosis. *Infect Imnzun* 1995; 63: 4178-41 80.

CURTSINGER, J.M.; VALENZUELA, J.O.; AGARWAL, P.; LINS, D.; MESCHER, M.F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. J Immunol. 2005;174:4465-4469.

DADAGLIO, G., FAYOLLE, C., ZHANG, X., RUFFEL, B., OBERKAMPF, M., FELIX, T., HERVAS-STUBBS, S., OSICKA, R., SEBO, P., LADANT, D. AND LECLERC, C. Antigen Targeting to CD11b+ Dendritic Cells in Association with TLR4/TRIF Signaling Promotes Strong CD8+ T Cell Responses. **The journal of immunology**, 2014, 193: 1787–1798.

DE CASTRO, L. F.; FERREIRA, M. C.; DA SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H.; LONGHI, L. N.; MAMONI, R. L. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomy-cosis. **J Infect;** 67(5):470–85, 2013

DE OLIVEIRA, L. L., COLTRI, K. C., CARDOSO, C. R., ROQUE-BARREIRA, M. C. & PANUNTO-CASTELO, A. T helper 1inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl.* **Trop. Dis**. 2, e183 (2008).

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. **J. Med. Microbiol**. v. 49, p. 37-46, 2000.

DINARELLO CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines.**ADV. Immunol**. V.44, p. 153-205, 1989.

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.

DO VALLE AC, COSTA RL, FIALHO MONTEIRO PC, VON HELDER J, MUNIZ MM, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol**. 39, 373–377 (2001).

DOYLE, S. N.; O'NELL, L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NFkB to new insights into transcriptional regulation in innate immunity. Biochem. Pharmacol., v. 72, p. 1102-1113, 2006.

DUBOURDEAU, M.; ATHMAN, R.; BALLOY, V.; HUERRE, M.; CHIGNARD, M.; PHILPOTT, D.J.; LATGE´, J.P. and O. IBRAHIM-GRANET. Aspergillus fumigatus induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. **J. Immunol**. 177:3994–4001. 2006.

ELLURU, S. R.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. The protective role of immunoglobulins in fungal infections and inflammation. **Semin Immunopathol,** 37:187–197, 2015.

EMA. Ecalta; summary of product characteristics. 15-10-2009. Available from: www.ema.europa.eu/humandocs/Humans/ EPAR/ecalta/ecalta.htm [Last accessed on 12-2009]

EMA. Mycamine; summary of product characteristics. 14-09-2011. Available from: www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/ EPAR/mycamine/mycamine.htm [Lastaccessed on 09-2012]

European Medicines Agency. Cancidas; summary of product characteristics. 28-09-2011. Available from: www.ema.europa.eu/ humandocs/Humans/EPAR/cancidas/cancidas.htm [Last accessed on 10-2011]

FARIAS, M.R.; CONDAS, L.A.; RIBEIRO, M.G.; et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia.** 2011, 172, 147–152.

FAVA, S.C.; NETTO, C.F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo**. v.40 (3), p.155-64, 1998.

FAZIOLI, R. A. Paracoccidioidomicose experimental murina. Estudo da proliferação e da contribuição de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ na resposta imune de camundongos resistentes e susceptíveis. **Tese de doutorado, ICB, USP**, 1997.

FERIOTTI, C., BAZAN, S.B., LOURES, F.V., ARAÚJO, E.F., COSTA, T.A., CALICH, V.L. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**. 2015.

FERIOTTI, C., DE ARAÚJO, E.F., LOURES, F.V., DA COSTA, T.A., GALDINO, N.A.L., ZAMBONI, D.S., CALICH, V.L.G. NOD-Like Receptor P3 Inflammasome Controls Protective Th1/Th17 Immunity against Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Front Immunol**. 10;8:786, 2017.

FITZGERALD KA, ROWE DC, BARNES BJ, CAFFREY DR, VISINTIN A, LATZ E, MONKS B, PITHA PM, GOLENBOCK DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NFkappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. **J Exp Med** 2003, 198: 1043 – 1055

FITZGERALD, K.A.; MCWHIRTER, S.M.; FAIA, K.L.; ROWE, D.C.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D.T.; COYLE, A.J.; LIAO, S.M.; MANIATIS, T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. **Nat Immunol.** 2003, 4:491 – 496

FORNAZIM, M.C; BALTHAZAR, A.; QUAGLIATO, R. Jr.; *et al*. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. ***Eur Respir J***. 2003; 22: 895–899.

FRANCO, M.. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** 20: 129-132, 1987.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med**. Trop., 20: 129-132, 1987.

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

GAVIN, M. A.; RASMUSSEN, J. P.; FONTENOT, J. D.; VASTA, V.; MANGANIELLO, V. C.; BEAVO, J. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. **Nature.** V.7129, p. 771-5, 2007.

GAY, N.J.; GANGLOFF, M.; O'NEILL, L.A. (2011) What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. **Trends Immunol** 32: 104 – 109.

GEZUELE, E.; Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de un pingüino de la Antártida. In: *Proceedings IV International Symposium on Paracoccidioidomycosis.* Caracas, Venezuela, 10–14, 1989.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia,** v.58, p.63-70, 1976.

GONZALES, A., SAHAZA, J. H., ORTIZ, B. L., RESTREPO, A., CANO, L. E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. ***Medical Mycology***, 2003, **4 1,** 39 1 -399.

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeuslituratus*) in Colombia, SA. *Sabouraudia* 1965, 4, 124–125.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu. Rev. immunol., v. 20, p. 612-67,2002.

GUO L, W. E. I. G.; ZHU, J.; LIAO, W.; LEONARD, W. J.; ZHAO, K.; et al. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(32):13463–8, 2009.

HAHN, R.C.; MACEDO, A.M.; FONTES, C.J.; BATISTA, R.D.; SANTOS, N.L.; HAMDAN, J.S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol**. 41, 2849–2854 (2003).

HWAND, S. L.; CHUNG, N. P.; CHAN, J. K.; LIN, C. L. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. **Cell Res.** V.3, p. 167-75, 2005.

HERTZOG, P. **A Notch in the Toll Belt.** J Immunity. 2008;10:663-665.

HERVAS-STUBBS, S.; OLIVIER, A.; BOISGERAULT, F.; THIEBLEMONT, N.; LECLERC, C. TLR3 ligand stimulates fully functional memory $CD8^+$ T cells in the absence of CD4+ T-cell help. **Blood** 2007;109(12):5318–26.

HOLT, S.L.; DREW, R.H. Echinocandins: addressing outstanding questions surrounding treatment of invasive fungal infections. **Am J Health Syst.** V.68, P. 1207-20, 2011.

HUFFNAGLE, G. B. **Fungal Immunology**: From an Organ Perspective. New York: Springer, 2005. P. 201-228.

HUFFNAGLE, G.G., DEEPE, G.S. Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Curr Opin Microbiol**. v. 6, p. 344-350, 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Cities, September 12, 2016. [in Portuguese] [cited 2017 June 29]. http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=330170

JOUAULT, T.; SARAZIN, A.; MARTINEZ-ESPARZA, M.; FRADIN, C.; SENDID, B.; POULAIN, D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans.* **Cell. Microbiol**. **11**, 1007–1015 (2009).

KAGAN, J.C.; SU, T.; HORNG, T.; CHOW, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. **Nat Immunol**. 2008, 9: 361 – 368

KAMINAGAKURA, E.; BONAN, P.R.; JORGE, J.; ALMEIDA, O.P.; SCULLY, C. Caracterization of inflammatory cells in oral paracoccidiodomycosis. **Oral Dis**. v.13 (4), p. 434-9, 2007.

KARIKÓ, K.; NI, H.; CAPODICI, J.; LAMPHIER, M.; WEISSMAN, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. **J Biol Chem** 2004;279(13):12542-12550.

KASHINO, S. S., FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZCA, BURGERE. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine**; 20(1):89e97, 2000.

KASHINO, S.S., CALICH, V.L.G., SINGER-VERMES, L.M., ABRAHAMSOHM, P.A., BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of tem Paracoccidioides brasiliensis isolates. **Mycopathologia**, v.99, p.119-128, 1987.

KASHIRO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection Is Linked to a Preferential Th1 Immune Response, Whereas Susceptibility Is Associated with Absence of IFN-*g* Production. **JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH** 20:89–97, 2000.

KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity** 2011, 34: 637 – 650

KAWAI, T. & AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol**. **11**, 373–384 (2010)

KAWAI, T., AKIRA, S. **TLR signaling**. Cell. Death. Differ. 13, 816-825, 2006.

KOLUMAM, G.A.; THOMAS, S.; THOMPSON, L.J.; SPRENT, J.; MURALI-KRISHNA, K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. **J Exp Med**. 2005;202:637-650.

KULLBERG BJ, NETEA MG, VONK AG, VAN DER MEER JW. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *FEMS* **Inznzulzol Med Microbiol** 1999; 26: 299-307.

KURITA N, OARADA M, MIYAJI M, ITO E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorpl~oi~uclealre ukocytes against yeast cells of *Puracocci~lioides hrasilier~sis*. **Med Mycol** 2000; 38: 177-182.

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**. cap. 1, p. 1-7, 1982.

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

LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C.; MACARRON, R. Contribuição, para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidino-positivos. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 1: 245-259,1959.

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

LE BOM, A.; DURAND, V.; KAMPHUIS, E.; et al. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8_ T cell response during cross-priming. J Immunol. 2006; 176:4682-4689.

LEE, K.G.; XU, S.; KANG, Z.H.; HUO, J.; HUANG, M.; LIU, D.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; LAM, K.P. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2012, 109: 5791 – 5796

LESTER SN, LI K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. **J. Mol. Bio**. V.426, p. 1246-64, 2013.

LIANG, S. C.; TAN, X. Y.; LUXENBER,G.; KARIM R, D. P.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; COLLINS, M.; et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med;** 203(10):2271–9, 2006.

LIU, W.; MENORET, A. AND VELLA, T. Responses to LPS boost effector CD8 T-cell accumulation outside of signals 1 and 2. **Cellular & Molecular Immunology,** 2015, 1-11.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Paracoccidioidomicose: estudo clinico-micologico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. J. Pneumol.,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*. **Proc. Natl. Acad. USA**. v. 80, p. 7659-7663, 1983.

LOPERA, D., NARANJO, T. W., CRUZ, O. G., RESTREPO, A., CANO, L. E., LENZI, H. L. Structural and Topographic Dynamics of Pulmonary Histopathology and Local Cytokine Profiles in Paracoccidioides brasiliensis Conidia-Infected Mice. **Plos Neglented Tropical Diseases**, 2011, vol 5, 7, e1232, 1-9.

LOPERA, D.; NARANJO, T.W.; CRUZ,O.G.; RESTREPO, A.; CANO, L.E.; LENZI, H.L. Structural and Topographic Dynamics of Pulmonary Histopathology and Local Cytokine Profiles in Paracoccidioides brasiliensis Conidia-infected Mice. **PLOS Neglected tropical Disease**, 2011.

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. **Infect. Immun**. v. 62, p. 2761-2772, 1994.

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

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

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

M. YONEYAMA, M.; KIKUCHI, T.; NATSUKAWA, N.; SHINOBU, T.;IMAIZUMI, M.; MIYAGISHI, K.; T AIRA, S.; AKIRA, T.; FUJITA. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nat. Immunol**., v. 5 , 730-737, 2004.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.; BACA, C.; CURCELL, E.D.; et al. Epidemiological aspects of PCM in the endemic área of Botucatu . **Rev. Inst. Trop. S. Paulo**. 25:87-92, 1983.

MATUTE, D.R., MCEWEN, J.G., MONTES, B.A., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J.T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEGA, G., TAYLOR, J.W., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus Paracoccidioides brasiliensis as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol**. Evol. 23, 65–73.

McEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia**. J. Med. Vet. Mycol**. 25(3):165-75, 1987.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C.A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**. 91: 295-308, 1997.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, J. C. Fly immunity: great expectations. Genome **Biol**. 2000.

MEIER, A., KIRSCHNING, C. J.; NIKOLAUS, T.; WAGNER, H.; HEESEMANN, J. and EBEL, F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. **Cell. Microbiol.** 2003, 5:561–570.

MENINO, J. F.; SARAIVA, M.; GOMES-ALVES, A. G.; LOBO-SILVA, D.; STURME, M.; GOMES-REZENDE, J.; SARAIVA, A. L.; GOLDMAN, G. H.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; ROMANI, L.; PEDROSA, J.; CASTRO, A. G.; RODRIGUES, F. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival.**PLoS Negl Trop Dis**. 2013; 25;7:e2317.

MEYLAN, E.; BURNS, K.; HOFMANN, K.; BLANCHETEAU, V.; MARTINON, F.; KELLIHER, M.; TSCHOPP, J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. **Nat Immunol**. 2004, 5: 503 – 507

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Pathology. In Franco, M.F., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. **Paracoccidioidomycosis.** Nova York: CRC Press, 1994.

MOREJÓN, K.M.; MACHADO, A.A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. **Am. J. Trop. Med**. *Hyg*. 80, 359–366 (2009).

MORETTI, S., BOZZA, S., MASSI-BENEDETTI, C., PREZIOSO, L., ROSSETTI, E., ROMANI, L., AVERSA, F., PITZURRA, L. An immunomodulatory activity of micafungin in preclinical aspergillosis. **J Antimicrob Chemother**. 69(4):1065-74, 2014

MOSMANN, T. R.; SCHUMAKER, J. H.; STREET, N. F.; BUD, R.; O'GARRA, A.; BOND, M.W.; MOORE, K.W.M.; SHER, A.; FIORENTINO, D.F. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD41 T cells. **Immunol. Rev**. 123, 209–229, 1991.

MÜLLER, V., VIEMANN, D., SCHMIDT, M., ENDRES, N., LUDWIG, S., LEVERKUS, M., ROTH, J., GOEBELER, M. Candida albicans triggers activation of distinct signaling pathways to establish a proinflammatory gene expression program in primary human endothelial cells. **J Immunol**. 15;179(12):8435-45, 2007.

NAHUMA, A.; DADIC, H.; BATESC, A.; ROIFMAN, C.M. The biological significance of TLR3 variant, L412F, in conferring susceptibility to cutaneous candidiasis, CMV and autoimmunity. **Autoimmun. Rev**. 5:341-7, 2012.

NETEA MG, VAN TITS LJ, CURFS JH, *et al*. Increased susceptibility of TNF-a lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. **JImmunol**. *1999;* 163: 1498 - 1505

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

NETEA, M.G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; VAN KRIEKEN, J.H.; HARTUNG, T.; ADEMA, G.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J. Immunol**., v. 72, p. 3712-3718, 2004.

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

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIORDANOU, P. M.; BLOTTA, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**;4(2):139e44, 2002.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J.H.; PAPPAS, P.G.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; HOROWITZ, H.W.; POWDERLY, W.G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C.A.; CLEARY, J.; MANGINO, J.E.; LEE, J.: Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream Candida isolates in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**. 2003, 47:3149–3154.

PAGLIARI, C.; FERNANDES, E. R.; STEGUN, F. W.; DA SILVA, W. L.; SEIXAS-DUARTE, M. I.; SOTTO, M. N. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cuta-neous and mucosal lesions. **Microb Pathog** 50(5):263–7, 2011.

PAGLIARI, C.; FERNANDES, E.R.; STEGUN, F.W.; DA SILVA, W.L.; SEIXAS DUARTE, M.I.; SOTTO, M.N. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microb. Pathog**. 50(5), 263–267 (2011).

PAGLIARI, C.; PEREIRA, N. V; KANASHIRO, L; et al . Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis.J Cutan Pathol 2009.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia Medica**. Porto Alegre: PUCRS. v.15, n4, p. 274-278. 2005.

PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; SOBEL, J.D.; et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis** 2004;38(2):161-89

PERRUCCIO, K.; TOSTI, A.; BURCHIELLI, E.; TOPINI, F.; RUGGERI, L.; CAROTTI, A.; CAPANNI, M.; URBANI, E.; MANCUSI, A.; AVERSA, F.; MARTELLI, M. F.; ROMANI, L.; VELARDI, A. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. **Blood.** 106(13):4397-4406, 2005.

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

QUEIROZ-TELLES, F. Tratamento da Paracoccidioidomicose. In: Foccacia R (ed) Tratado de Infectologia, 3a edição, **Atheneu Editora**, São Paulo, p.1395-1402, 2005.

RA, HARMSEN AG. Interleukin-1: an important mediator of host resistance against *Pneumocystis carinii*. **J Exp Med** 1992; 176: 713-718.

REDLICH, S.; RIBES, S.; SCHUTZE, S.; EIFFERT, H.; NAU, R. Toll-like receptor stimulation increases phagocytosis of Cryptococcus neoformans by microglial cells. **Journal of Neuroinflammation**, 2013, 10:71

REIS e SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptative immunity. Curr. Opin. Immunol. 2004, 16:21–25p.

REIS, F.; COLLIER, P.P.; SOUZA, T.F.; *et al*. Neuroparacoccidioidomycosis (NPCM): magnetic resonance imaging (MRI) findings. **Mycopathologia** 175, 181–186 (2013).

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

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**. Infect. Immun**. v. 46, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, A.; TOBO´N, A.M. Paracoccidioides brasiliensis, In MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. **Elsevier** vol.7, p.3357–3363, 2009.

RESTREPO-MORENO, A. Infections agents and pathogenesis – fungal infections and immune responses. **Edited by Juneann** W. Murphy, Herman Friedman & Mauro Bendinelli. New York, cap. 10, p. 251-276, 1993.

RESTREPO-MORENO, A. Infections agents and pathogenesis – fungal infections and immune responses. Edited by Juneann W. Murphy, Herman Friedman & Mauro Bendinelli. **New York, cap**. 10, p. 251-276, 1993.

RETINI C, VECHARIELLI A, MONARI C, TASCINI C, BISTONI F, KOZEL TR. Capsular polysaccliaride of *Cryptococcus izeofornzans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. **Infect Imrnun** 1996; 64: 2897-2903.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Rev. Immunol**. **4**, 1–23, 2004.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**. v. 11, 275-287, 2011.

ROPERT, C.; FRANKLIN, B. S.; GAZZINELLI, R.T. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. **Semin. Immunopathol.**, v. 30, p. 41-51, 2008.

RUAS, L. P.; BERNARDES, E. S.; FERMINO, M. L.; DE OLIVEIRA, L. L.; HSU, D. K.; LIU, F. T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis*toward a Th2-biased immunity. **PLoS One.,** v. 4, p. 4519-4524, 2009.

RUDNER, X. L.; HAPPEL, K.I.; YOUNG, E. A.; SHELLITO, J. E. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. **Infect Immun,** 75(6):3055–61,2007.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; Iturriaga, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol**. 40, 225–242, 2002.

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

SCHELENZ S, SMITH DA, BANCROFT GT. Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus funzigatus:* obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. *Med Mycol* 1999; 37: 183- 194.

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 (2), p.115-8, 1979.

SHIKANAI-YASUDA MA, TELLES FILHO FQ, MENDES RP et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 39(3), 297–310,2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 39 (3), p.297-310, 2006.

SHOHAM S, HUANG C, CHEN J-M, GOLENBOCK DT, LEVITZ SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF release in re- sponse to Cryptococcus neoformans polysaccharide capsule. **J Immunol** 2001; 166:4620–5.

SINGER-VERMES, L.M.; CIAVAGLIA, M.C.; KASHINO, S.S.; BURGER, E.; CALICH, V.L. The source of the growth-promoting factor (s) affects the plating efficiency of Paracoccidioides brasiliensis. **J. Med. Vet. Mycol**. 30: 261-4, 1992.

SMITH, J.G.; MAGEE, D.M.; WILLIANS, D.M.; GRAYBILL, J.R. Tumor necrosis factor alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **J. Infect. Dis**. 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.

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*. **Infect Immun**.v. 51, p.199-203. 1986.

SUCHER, A.J.; CHAHINE, E.B.; BALCER, H.E.: Echinocandins: the newest class of antifungals. **Ann Pharmacother** 2009, 43:1647–1657.

TAKEDA, K.; KAISHO, T. and AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol** 2003, 21:335-376p.

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

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; OLIVEIRA, F.F.; et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med. Mycol**. 2013 (Epub ahead of print).

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

THOMPSON, J. M.; IWASAKI, A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 60, p. 786-794, 2008, Review.

TRACEY KJ, CERAMI A. Tumor ilecrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *All11 Rer Med* 1994; 45: 491 -503. Tracey KJ. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-x). In: Tlioinpson A (ed.). *Tlze Cytokirze Hu~zcll~oo*Lk.o ndon: Academy Press, 1994: 289-304.

TREJO-CHAVEZ, A.; RAMÍREZ-ROMERO, R.; ANCERRODRIGUEZ, J.; NEVAREZ-GARZA, A.M.; RODRIGUEZTOVAR, L.E. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepusdidactylus*). **J. Comp. Pathol**. 2011, 144, 231–234.

ULLMANN, A.J.; AKOVA, M.; HERBRECHT, R.; et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). **Clin Microbiol Infect,** 2012;18(Suppl 7):53-67

UNTEREINER, W.A.; SCOTT, .JA.; NAVEAU, F.A; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia** 2004, 96, 812–821.

VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; GOW, N. A. & NETEA, M. G. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr. Opin**. **Microbiol**. **11**, 305–312, 2008.

VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; GOW, N. A.; NETEA, M. G. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr. Opin. Microbiol**. v. 11, 305–312, 2008.

VERSTREPEN, L.; BEKAERT, T.; CHAU, T.L.; TAVERNIER, J.; CHARIOT, A.; BEYAERT, R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. **Cell Mol Life Sci**. 2008, 65: 2964 – 2978

VILLAMON E, GOZALBO D, ROIG P, O'CONNOR JE, FRADELIZI D, GIL ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. **Microbes Infect** 2004; 6:1–7.

WANKE B, LONDERO A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno, Del Negro G, eds. Paracoccidioidomycosis. **Boca Raton: CRC Press.** 1994: 109-20.

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

WHITSETT, J. A. AND ALENGHAT, T. Respiratory ephithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nature immunology Review**, 2015, v. 16.

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

YAMASHITA, M.; CHATTOPADHYAY, S.; FENSTERL, V.; SAIKIA, P.; WETZEL, J.L.; SEN, G.C. Epidermal growth factor receptor is essential for Toll-like receptor 3 signaling. **Sci Signal**. 2012.

YAUCH, L. E., MANSOUR, M. K.; SHOHAM, S.; ROTTMAN, J. B. and LEVITZ, S. M. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans in vivo*. **Infect. Immun**. 2004, 72:5373–5382.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, J. F.; ROMO-MARTINEZ, E. J.; DURAN-AVELAR, M. D. E. J.; GARCIA-MAGALLANES, N.; VIBANCO-PEREZ, N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. **Int J Inflam** 2014:651503, 2014.

ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. ***Eur J Immunol*** (2007) 37(10):2695–706.

ZELANTE, T.; DELUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur. J. Immunol**, 2007, 37:2695–706.

ZHONG, B.; YANG, Y.; LI, S.; WANG, Y.Y.; LI, Y.; DIAO, F.; LEI, C.; HE, X.; ZHANG, L.; TIEN, P.; et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. **Immunity**, 2008, 29: 538 – 550

8. ANEXOS