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

Caracterização da inter-relação entre as vias de sinalização Notch e TLR na paracoccidioidomicose experimental

Lavínia Maria Dal'Mas Romera

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2016

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

Caracterização da inter-relação entre as vias de sinalização Notch e TLR na paracoccidioidomicose experimental

Lavínia Maria Dal'Mas Romera

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Romera, Lavínia Maria Dal'Mas
R763c Caracterização da inter-relação entre as vias de sinalização Notch e TLR na paracoccidioidomicose experimental / Lavínia Maria Dal'Mas Romera. -- São Paulo, 2016.
127p.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Paracoccidioidomicose : Medicina 2. Imunologia celular 3. Micologia médica I. T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

616.969 CDD

Lavínia Maria Dal'Mas Romera

Caracterização da inter-relação entre as vias de sinalização Notch e TLR na paracoccidioidomicose experimental

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, Agosto de 2016.

Dedico este trabalho à minha família, meus maiores inspiradores!

Minha prece de agradecimento à Deus

"Estou dando um passo para fora da porta e estou flutuando no jeito mais peculiar e as estrelas parecem muito diferentes hoje" (David Bowie)

Obrigada por ter me dado o que eu precisava para chegar até aqui!

À minha família

"Lá em cima sinto como se estivesse vivo pela primeira vez ainda lá em cima eu estou forte o suficiente para pegar esses sonhos e torná-los meus, você pode me levar bem mais alto? No lugar onde os cegos veem. Você pode me levar bem mais alto? No lugar com ruas douradas." (Creed)

Não tenho palavras para expressar o quanto vocês foram importantes nesta jornada. Todo apoio, amor, carinho e compreensão foram essenciais.

Pai, mãe

Obrigada pela paciência, pela motivação, pelas palavras, pelas risadas, por ganhar "colo" quando mais precisava! Obrigada por serem esses pais maravilhosos! ***Júlio, irmão,***

Obrigada pelas conversas, pelo carinho, por permitir que eu estivesse sempre ao seu lado. A minha ***avó Norma****, que sempre acreditou um mim. Meu amor por você será eterno! Aos meus avós* ***Mário, Antônio*** *(in memoriam) e* ***Tercília*** *todo meu carinho e respeito por vocês serão eternos.*

Ao Rudney

"Nós mantemos este amor numa fotografia; Nós fizemos estas memórias para nós mesmos; Onde nossos olhos nunca fecham; Nossos corações nunca estiveram partidos; E o tempo está congelado para sempre" (Ed Sheeran)

Você entrou na metade desta jornada, e deste então vivenciou toda esta loucura, a conquista de um sonho. Obrigada pela força, pela compreensão, pelo carinho, pelo amor, e principalmente pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Suas críticas, sua incrível lógica de encarar a vida e o seu apoio foram importantes na finalização deste trabalho.

Aos amigos

"Venha como você é, como estiver; Como quero que você seja; Como um amigo, como um amigo, como um velho inimigo; Não perca tempo, rápido; A escolha é sua, não se atrase; Descanse, como um amigo, como uma velha memória" (Nirvana)

Cada um sabe a importância que tem nesta jornada. Agradeço todos vocês que me apoiaram, mesmo longe. Agradeço pelas longas conversas, pelo carinho, e principalmente pela amizade. Amigos são a família que escolhemos. E tenho certeza que vocês são minha família.

Grasi, *imensa amiga, parece que nos conhecemos muito além desta vida. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelas loucas aventuras, por ser essa*

pessoa especial, e principalmente por poder compartilhar momentos importantes na minha vida!

Miriam, a japinha mais fantástica do mundo. Amiga confidente. Já sinto sua falta. Obrigada por tudo!

Zé, grande amigo! Os dias no laboratório foram sempre bons com a sua alegria, com as suas analogias sobre futebol, e principalmente, pois você sempre presenciou os foras que eu dava nos experimentos. Obrigada pela amizade!

Gil, obrigada pela ajuda, pelo apoio, pelas inúmeras tentativas de cultivar as hek. Obrigada por tudo!

Polly, amiga, suas frases de efeito sempre foram as melhores no laboratório. Obrigada pela amizade!

Laryssa e **Ingrid**, grandes amigas de longos anos. Suas palavras acolhedoras sempre foram importantes. Não poderia deixar de agradecê-las pelo carinho, pela amizade e pela cumplicidade.

Amo vocês!

Aos amigos do Laboratório de Micologia e do Departamento

"Esta é nossa última dança; Isto somos nós mesmos; Sob pressão; Sob pressão; Pressão" (Queen)

Ao **Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida**, por mais uma vez, acreditar na minha capacidade, me orientar, e confiar novamente por 4 anos. Obrigada!

À **Prof. Dra. Karen Spadari Ferreira**. Agradeço por todos os momentos de convívio, pela sua atenção durante todas as minhas dúvidas. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelas conversas.

Aos amigos do Laboratório. **Grasi, Zé, Suelen, Leandro, Luana, Gil e Daniel** pelo companheirismo, pelo auxílio, dedicação e paciência. Aos amigos do Laboratório que já não estão mais, **Karla, Fábio, Polly, Nicole, Miriam, Hadassa.** Muito obrigada por tornarem cada minuto muito especial nestes 4 anos.

À **Sonia e Renata**. Obrigada por toda ajuda!

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro nestes 4 anos de trabalho e nos congressos que enriqueceram meu conhecimento e este trabalho.

Muito Obrigada!

"O tempo é o melhor autor: sempre encontra um final perfeito"

Charles Chaplin

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Romera, L.M.D. Caracterização da inter-relação entre as vias de sinalização Notch e TLR na paracoccidioidomicose experimental. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Resumo

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica de natureza profunda que afeta preferencialmente o tecido pulmonar podendo disseminar via linfo-hematogênica para outros órgãos e tecidos, sendo causada principalmente pelo *Paracoccidioides brasiliensis,* fungo que apresenta dimorfismo térmico. O sistema imune inato mediado por macrófagos é extremamente importante para o controle de infecções e está envolvido na indução e regulação da resposta imune/inflamatória. Estas células são capazes de reconhecer patógenos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como receptores Toll-like (TLR). Além desses PRRs, recentemente, demonstrou-se a importância da via de sinalização Notch no sistema imune inato e na regulação da atividade dos macrófagos. Nossos dados demonstram que a cepa Pb18 do *P. brasiliensis* é capaz de ativar o receptor Notch1 em macrófagos J774. A ativação desse receptor concomitante com a ativação de TLR 4 (via LPS) induz a produção de IL-6, e apresenta elevada carga fúngica e menor fagocitose, o que favorece a patogenia. Ao utilizarmos um inibidor farmacológico da γ-secretase (DAPT) para inibir a ativação do receptor Notch1 em macrófagos, é possível observar diminuição da carga fúngica, diminuição de IL-6, aumento de TNF-α e aumento da fagocitose. Entretanto, a ausência do receptor TLR 4 em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos TLR $4^{-/-}$, na presença de DAPT, percebe-se diminuição da capacidade fagocítica desses macrófagos e também diminuição da carga fúngica, evidenciando a relação entre TLR 4 e Notch1. Em adição, realizamos um tratamento em camundongos BALB/c com DAPT previamente à infecção com Pb18. Nossos resultados evidenciaram que animais com este tratamento apresentaram diminuição da carga fúngica dos pulmões, diminuição de IL-6, ativação de macrófagos e aumento de IgG, após 45 dias de infecção, indicando um perfil de cura desses animais. O mesmo tratamento foi realizado em camundongos BALB/c NUDE, seguido da infecção com Pb18. Nestes animais, verificamos que há maior produção de citocinas pró-inflamatórias no pulmão, aumento de células $CD19^{+}$ e a carga fúngica dos animais tratados manteve-se similar ao dos animais não tratados, indicando que o perfil protetor observado em animais com DAPT é dependente da resposta das células T. Juntos, esses resultados evidenciam que o Pb18 é capaz de ativar o receptor Notch1 em macrófagos e utiliza a via de sinalização Notch-TLR 4 como um possível mecanismo de escape, podendo fornecer uma nova abordagem de estudo da imunidade envolvida na paracoccidioidomicose experimental.

Palavras Chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, Macrófagos, Notch, TLR 4, DAPT.

Romera, L.M.D. Characterization of the inter-relationship between Notch and TLR signaling pathways in experimental paracoccidioidomycosis. Thesis (PhD in Clinical Analysis) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Abstract

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis of deep nature that primarily affects the lung and can spread via lymphatic and hematogenous to other organs and tissues. It is mainly caused by *Paracoccidioides brasiliensis* fungus which exhibit thermal dimorphism. The innate immune system mediated by macrophages is extremely important for the control of infection and is involved in the induction and regulation of immune/inflammatory response. These cells are able to recognize pathogens through pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLR). Beyond these PRRs, the importance of Notch signaling has recently been demonstrated in the innate immune system and the regulation of macrophage activity. Our data demonstrate that the Pb18 strain of *P. brasiliensis* is able to activate the Notch1 receptor in J774 macrophages. Activation of this receptor with also activation of TLR 4 (via LPS) induces IL-6 production, induces phagocytosis and decreases fungal burden, which favors the pathogenesis. By using a γ-secretase pharmacological inhibitor (DAPT) for inhibiting the activation of Notch1 receptor on macrophages, it is possible to observe decreased fungal burden, less production of IL-6, and increased TNF-α and phagocytosis. However, due to the absence of TLR 4 receptor in bone marrow derived macrophages from TLR $4^{-/-}$ mice, these macrophages showed decreased phagocytic ability and also reduced fungal burden in the presence of DAPT, showing a relationship between TLR 4 and Notch1. In addition, we made a treatment with DAPT in BALB/c mice prior to infection with Pb18. And our results showed that DAPT-treated animals exhibited a decrease of fungal burden in the lungs, and a decrease of IL-6. Furthermore, we observed an increase of IgG after 45 days of infection, indicating probably a healing of these animals. Same treatment was made in BALB/c NUDE mice, followed by infection with Pb18. In these animals, we observed an increased production of proinflammatory cytokines in the lung and increased $CD19^{+}$ cells, but fungal burden was similar in both group (treated and untreated), which indicates that treatment with DAPT is dependent on T cell response. Taken together, these results showed that Pb18 is able to activate the Notch 1 receptor on macrophages and uses the Notch-TLR 4 signaling pathway as a possible escape mechanism, and may provide a new immunity study approach in experimental paracoccidioidomycosis.

Key Words: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, Macrophages, Notch, TLR 4, DAPT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Célula leveduriforme do isolado* ***P. brasiliensis*** *Pb18.* *29*

Figura 2. *Ativação de macrófagos durante infecção pulmonar por fungo, evidenciando a plasticidade..* *41*

Figura 3. *Esquema dos receptores de reconhecimento na resposta imune inata contra fungos.* *42*

Figura 4. *Representação esquemática da cascata de sinalização mediada pelos receptores da família TLR* *44*

Figura 5. *Sinalização Notch.* *47*

Figura 6. *Tratamento com DAPT* *61*

Figura 7. *Análise transcricional do receptor Notch 1 em macrófagos J774 após interação de 24 horas com leveduras do Pb18.* *66*

Figura 8. *Unidades formadoras de colônias após 24 horas de interação entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18 na presença ou ausência de LPS/DAPT* *67*

Figura 9. *Perfil da secreção de IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18* *69*

Figura 10. *Perfil da secreção de TNF-α após interação de 4, 12 e 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18* *70*

Figura 11. *Determinação da citotoxicidade do Pb18 em macrófagos J774 após interação de 4, 12 e 24 horas com leveduras de Pb18, na presença ou ausência de LPS/DAPT* *71*

Figura 12. *Unidades formadoras de colônias após cinética de interação (4, 12 e 24 horas) entre BMDMs e leveduras de Pb18 na presença ou ausência de LPS/DAPT.* *72*

Figura 13. *Índice de fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs após cinética de interação (4, 12 e 24 horas) na presença ou ausência de LPS/DAPT, observada por microscopia.* *73*

Figura 14. *Fagocitose de leveduras de Pb18 por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c na presença ou ausência de LPS/DAPT, observada por microscopia.* *74*

Figura 15. *Perfil da secreção de IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas entre BMDMs e leveduras de Pb18* *75*

Figura 16. *Perfil da secreção de TNF-α após interação de 4, 12 e 24 horas entre BMDMs e leveduras de Pb18* *76*

Figura 17. *Comparação entre as unidades formadoras de colônias após 24 horas de interação entre BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR 4$^{-/-}$ e leveduras de Pb18 na presença ou ausência de LPS/DAPT.* 77

Figura 18. *Índice de fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs de camundongos C57BL/6 e TLR 4$^{-/-}$ após inibição da sinalização Notch, observada por microscopia* 78

Figura 19. *Fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs de camundongos C57BL/6 na presença ou ausência de DAPT, observada por microscopia* 79

Figura 20. *Fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs de camundongos TLR 4$^{-/-}$ na presença ou ausência de DAPT, observada por microscopia* 80

Figura 21. *Perfil da secreção de IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas entre BMDMs e leveduras de Pb18* 81

Figura 22. *Unidades formadoras de colônias dos pulmões de camundongos BALB/c tratados com DAPT por 15 dias e infectados com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias* 83

Figura 23. *Perfil das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6)* 84

Figura 24. *Porcentagem das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6).* 85

Figura 25. *Perfil das células T dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6)* 86

Figura 26. *Porcentagem das células T dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6)* 87

Figura 27. *Perfil das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6)* 88

Figura 28. *Porcentagem das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6).* 89

Figura 29. *Perfil de produção de citocinas dos pulmões de camundongos BALB/c tratados com DAPT por 15 dias e infectados por 24 horas, 20 dias e 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6)* 91

Figura 30. *Produção de IgG total após tratamento intraperitoneal de 15 dias com DAPT seguida de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias* 92

Figura 31. *Isotipos de IgG1 após tratamento intraperitoneal de 15 dias com DAPT seguida de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias*.....93

Figura 32. *Isotipos de IgG2a após tratamento intraperitoneal de 15 dias com DAPT seguida de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias*.....94

Figura 33. *Ensaio de linfoproliferação com esplenócitos de baço de camundongos tratados (DAPT) e não tratados (DMSO), infectados com leveduras de Pb18 (10^6) por 20 dias*.....95

Figura 34. *Dosagem de IFN-γ após proliferação dos linfócitos por 5 dias.*.....96

Figura 35. *Unidades formadoras de colônias dos pulmões de camundongos BALB/c NUDE tratados com DAPT por 15 dias e infectados com leveduras de Pb18 (10^6) por 45 dias.*.....97

Figura 36. *Porcentagem das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6).*.....98

Figura 37. *Perfil das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6)*.....99

Figura 38. *Porcentagem das células dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6)*.....100

Figura 39. *Perfil das células dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6)*.....101

Figura 40. *Perfil de produção de citocinas dos pulmões de camundongos BALB/c NUDE tratados com DAPT por 15 dias e infectados por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6).*.....102

Figura 41. *Perfil de produção de citocinas dos linfonofodos de camundongos BALB/c NUDE tratados com DAPT por 15 dias e infectados por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6).*.....103

Figura 42. *Notch-TLR 4 como possível mecanismo de escape do Pb18 em macrófagos*.....113

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADAM : metalo-proteases

AP-1 : *Activator protein 1* (proteína ativadora 1)

APC : *Allophycocyanin* (allophicocianin)

BMDM : *Bone marrow derived macrophages* (macrófagos derivados de medula óssea)

BHI : *Brain Heart Infusion* (Infusão de cerébro e coração)

BSA : *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)

CEUA : Comitê de Ética em experimentação animal

CFA : Antígeno livre da parede do fungo

CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl Ester* (Éster de carboxifluorisceína succinimil)

CLR : receptores de lectina do tipo C

CpG : *cytosine–phosphate–guanine dideoxynucleotide* (citocina-fosfato-guanina dideoxinucleotideo)

CSL : *C*BF1, *S*uppressor of Hairless, *L*ag-1

CO_2 : Dióxido de carbono

CT : *Threshold Cycle* (limiar de detecção do ciclo)

DAPT : inibidor farmacológico da γ-secrease

DNA : ácido desoxirribonucleico

DNase : desoxirribunuclease

DMEN : meio Eagle modificado por Dulbecco

DMEN10 : DMEN com 10% SFB

DEPC : *Ultra pure DEPC treated water* (água ultra pura DEPC)

DTT : *Dithiothreitol* (ditiotreitol)

EGFLR : fator de crescimento epidérmico

EDTA : *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EtOH : Álcool etílico ou etanol

FITC : *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

FSC : *Foward Scatter* (dispersão frontal)

g : giros

GPI : glicofosfatidil inositol

GSI : inibidores da γ-secretase

ºC : graus Celsius

h : horas

HD : domínio de heterodimerização

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

Hey : *hairy-related transcriptional factor*

H_2SO_4 : ácido sulfúrico

IFN-γ : Interferon-gama

IL : Interleucina

iNOS : óxido sintase induzível

IRAK : quinase associada ao receptor de interleucina 1

IRF : fator regulatório de interferon

KO : nocaute

L : litros

LCCM : Meio de cultura condicionado de células L929 produtoras de M-CSF

LDH : lactato desidrogenase

LPS : lipopolissacarídeo

MAPK : *mitogen activated protein kinase* (proteína quinase ativadora de mitógeno)

MAP : proteína ativadora de mitógeno

MEN NEAA : aminoácidos não essenciais

M-CSF : Fator de crescimento que estimula a produção de monócitos

mg : miligramas

mL : mililitros

μ : micro

$MgCl_2$: cloreto de magnésio

MiliQ : água deionizada purificada em sistema MiliQ da Millipore Corporation

MO : macrófagos

MOPS : 3 - [N-morfolino] propano – ácido sulfônico

MYD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88* (Gene de resposta primária a diferenciação mieloide)

N : normal

nm : nanomolar

NICD : *Intracelular Domain of Notch* (Domínio intracelular de Notch)

NF-κB : fator nuclear kappa B

NO : óxido nítrico

NLS : sinais de localização celular

OPD : *o-phenylenediamine dihydrochloride* (dihidroclorato o –fenilenodiamina)

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

Pb18 : cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM : Paracoccidioidomicose

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

PBS – T: Solução Salina de Fosfato Tamponada com 0,05% Tween 20

PCM : Paracoccidioidomicose

PCR : reação de polimerase em cadeia

qPCR : reação de polimerase em cadeia em tempo real

PercP : *Peridinin chlorophyll* (peridina clorofila)

PE : ficoeretrina

PI : Iodeto de propídio

PGN : peptidioglicanas

PS : prenisilinas

PBS : tampão fosfato salino

PRR : *pattern recognition receptor* (receptor de reconhecimento padrão)

R10 : RPMI com 10 % de SFB

RBPJ : CBF1 (fator de ligação ao promotor 1)

RNA : ácido ribonucleico

RNase : ribonuclease

rpm : Rotações por minuto

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

SARM : *Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein*

SFB : Soro Fetal Bovino

SSC : *Side Scatter* (dispersão lateral)

SPF : *Specific Patogens Free* (Livre de patógenos específicos)

STAT : *signal transducer and activation of transcription* (sinal de transdução e ativação de transcrição)

shRNA : *small hairpin RNA*

SLE : *Systemic lupus erythematosus* (Lúpus eritematosa sistêmica)

TAD : ativação transcricional

TBE : Tampão Tris/Borato/EDTA

TIR : *Toll/Interleukin-1 receptor* (Receptor Toll/IL-1)

TIRAP : *TIR domain-containing adaptor protein* (Proteína adaptadora contendo domínio TIR)

Th : Células T *helper*

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

TMB : tetrametilbenzidina

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

TGFβ : Fator de transformação do crescimento

TRAM : *Toll like receptor 4 adaptor protein* (proteína adaptadora do receptor Toll like 4)

TRAF : fator associado ao receptor de TNF

TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* (molécula adaptadora que induz interferon - β)

V : voltagem

VEGFR1 : *Vascular endothelial growth factor receptor 1 (receptor 1 de fator de crescimento do endotélio vascular)*

U : unidades

UV : ultravioleta

UFC : Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. Introdução ----------27

2. Objetivos ----------53

2.1 Objetivo Geral ----------53

2.2 Objetivos Específicos ----------53

3. Material e Métodos ----------54

3.1 Ensaios *in vitro* ----------54

3.1.1 Fungo----------54

3.1.2 Cultura de macrófagos da linhagem J774 ----------54

3.1.3 Preparo do inóculo do Pb18 ----------54

3.1.4 Inibição da via de Notch----------54

3.1.5 Análise da expressão gênica ----------55

3.1.5.1 Extração de RNA total----------55

3.1.5.2 Gel de Desnaturante----------55

3.1.5.3 Quantificação do RNA total ----------55

3.1.5.4 Pureza do RNA total ----------56

3.1.5.5 Tratamento de RNA com DNAse----------56

3.1.5.6 Síntese de cDNA----------57

3.1.5.7 PCR *em Tempo Real* ----------57

3.1.6 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento para diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)----------58

3.1.7 Obtenção de macrófagos derivados de medula (BMDMs) de camundongos BALB/c, C57BL/6 e TLR $4^{-/-}$ ----------58

3.1.8 Unidades formadoras de colônias----------58

3.1.9 Dosagem de citocinas (ELISA)----------59

3.1.10 Análise de morte celular promovida pelo fungo (LDH – Mensuração da Lactato desidrogenase)----------59

3.1.11 Ensaio de Fagocitose ----------60

3.2 Ensaios *in vivo* ----------60

3.2.1 Fungo----------60

3.2.2 Animais ----------60

3.2.3 Preparação do inóculo de Pb18 ----------61

3.2.4 Inibição da via de Notch----------61

3.2.5 Infecção Intratraqueal----------61

3.2.6 Antígeno Livre da Parede do Fungo (CFA)----------62

3.2.7 Dosagem de Imunoglobulinas totais e isotipos ----------62

3.2.9 Imunofenotipagem de células dos pulmões e dos linfonodos regionais após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção intratraqueal com leveduras do Pb18 por citometria de fluxo ----------62

3.2.8 Ensaio de Linfoproliferação ----------63

3.2.9 Dosagem de Citocinas----------64

3.3 Análise estatística----------65

4. Resultados ----------66

4.1 Ensaios com macrófagos J774----------66

4.1.1 Análise da expressão gênica do receptor Notch 1 em macrófagos após interação de 24 horas com leveduras do Pb18, na ausência e presença de DAPT ----------66

4.1.2 Análise das unidades formadoras de colônias do Pb18 após 24 horas de interação com macrófagos J774, na presença ou ausência de LPS/DAPT ----------67

4.1.3 Dosagem da produção de citocinas (IL-6 e TNF-α) após interação de 4h, 12h e 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras do Pb18, na presença ou ausência de LPS/DAPT ----------68

4.1.3.1 Dosagem de IL-6----------68

4.1.3.2 Dosagem de TNF-α ----------69

4.1.4 Análise de morte celular promovida pelo fungo ----------70

4.2 Ensaios com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c-------72

4.2.1 Análise das unidades formadoras de colônias após cinética de interação entre macrófagos derivados de medula óssea e leveduras de Pb18----------72

4.2.2 Ensaio de Fagocitose----------73

4.2.3 Dosagem da produção de citocinas (IL-6 e TNF-α) após interação de 4, 12 e 24 horas de interação entre macrófagos derivados de medula óssea e leveduras do Pb18, na presença ou ausência de LPS/DAPT ----------75

4.2.3.1 Dosagem de IL-6----------75

4.2.3.2 Dosagem de TNF-α ----------76

4.3 Ensaios com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e TLR $4^{-/-}$ ----------77

4.3.1 Análise das unidades formadoras de colônias após interação entre macrófagos derivados de medula óssea com leveduras do Pb18----------77

4.3.2 Ensaio de Fagocitose ----------78

4.3.3 Dosagem da produção da citocina IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas de interação entre macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e TLR $4^{-/-}$ e leveduras do Pb18, na presença ou ausência de DAPT ----------80

4.4 Ensaios de tratamento com DAPT em camundongos BALB/c ----------82

4.4.1 Análise das unidades formadoras de colônias de pulmões de camundongos tratados com DAPT após 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção----------82

4.4.2 Perfil das células pulmonares após tratamento com DAPT e infecção com leveduras de Pb18 por 20 dias----------83

4.4.3 Perfil das células T dos linfonodos após tratamento com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras de Pb18----------85

4.4.4 Perfil das células pulmonares após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção por 45 dias com leveduras de Pb18 ----------87

4.4.5 Perfil de citocinas no pulmão após tratamento com DAPT e infecção com leveduras de Pb18 por 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção ----------90

4.4.6 Dosagem de títulos IgG total e isotipos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção de 24 horas, 20 dias e 45 dias com leveduras do Pb18----------92

4.4.7 Ensaio de Linfoproliferação ----------95

4.4.8 Dosagem de IFN-γ após ensaio de linfoproliferação----------96

4.5 Ensaios de tratamento com DAPT em camundongos BALB/c NUDE----------97

4.5.1 Análise das unidades formadoras de colônias de pulmões de camundongos tratados com DAPT após 45 dias de infecção ----------97

4.5.2 Perfil das células pulmonares após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção por 45 dias com leveduras de Pb18 ----------98

4.5.3 Perfil das células dos linfonodos axilares e paratímicos após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção por 45 dias com leveduras de Pb18 ----------100

4.5.4 Perfil de citocinas do pulmão dos camundongos BALB/c NUDE após 15 dias de tratamento e infecção com leveduras do Pb18 por 45 dias----------101

4.5.5 Perfil de citocinas dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção com leveduras do Pb18 por 45 dias----------103

5. Discussão ----------104

6. Conclusão----------112

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----------114

ANEXO ----------127

1. Introdução

O aumento da incidência de infecções fúngicas é considerado um grave problema de saúde no mundo inteiro. Apesar dos estudos sobre os fungos responsáveis por essas micoses terem aumentado consideravelmente, sobretudo devido às infecções oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos, existe uma enorme lacuna sobre os mecanismos de reconhecimento, evasão e regulação dessas infecções fúngicas.

Com o passar dos anos, a doenças fúngicas apresentaram um aumento na sua prevalência. Infecções respiratórias fúngicas importantes na clínica médica, se iniciam com a inalação de propágulos infecciosos fúngicos, os quais são controlados pelo sistema imune de indivíduos imunocompetentes, que então não desenvolvem a doença. Entretanto, diversos fungos patogênicos, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* podem ser potencialmente fatais em indivíduos imunocomprometidos, incluindo soropositivos ou com terapias imunossupressivas (PARK & MEHRAD, 2009; POWDERLY, 1993; SAAG, et al., 2000; VAN DER HORST, et al., 1997; HUSAIN, et al., 2001). Dessa forma, a habilidade do sistema imunológico do hospedeiro de erradicar ou limitar o crescimento de fungos patogênicos nos pulmões é extremamente vital e importante (WAGER & WORMLEY, 2014).

Micoses sistêmicas consistem em infecções causadas por fungos patogênicos ou fungos com patogenicidade intrínseca pequena, que acaba sendo aumentada em pacientes imunocomprometidos, permitindo o estabelecimento da doença. Nas infecções respiratórias, o trato respiratório é o primeiro sítio de entrada, conduzindo à infecção inicial nos pulmões; o fungo, então, é capaz de disseminar via linfo-hematogênica para outros órgãos. Essas doenças têm uma distribuição geográfica restrita devido à ocorrência geográfica limitada dos agentes etiológicos. Após penetrar no corpo humano, o fungo geralmente ativa o sistema de defesa; temos assim, a infecção sem a doença, o que normalmente ocorre na coccidioidomicose, histoplasmose, criptococose e paracoccidioidomicose. Nestas condições, a infecção é totalmente silenciosa ou apresenta discretos sintomas, como febre, com ou sem nódulos; o estado infeccioso é detectado apenas por testes intradérmicos positivos utilizando os antígenos dos fungos. Às vezes observa-se o desenvolvimento da doença nesses indivíduos no decorrer dos anos após a infecção, devido à diminuição da resposta imune. Este evento ocorre após a exposição ao fungo, quando o paciente não vive mais nas áreas endêmicas, o que mascara o diagnóstico (RIVITTI & AOKI, 1999).

Inicialmente a paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita na cidade de São Paulo no Brasil em 1908, por Adolf Lutz (1855-1940), o qual publicou suas observações na revista “Brasil Médico”, afirmando ter obtido o cultivo do parasita a partir de lesões ocorridas em

indivíduos infectados. Após a descoberta da doença, iniciaram-se inúmeros registros de casos e tentativas de isolamento do fungo para a sua caracterização (LACAZ, 1982).

De 1908 até 1915, Alfonso Splendore estudou casos da PCM, caracterizando melhor as células fúngicas e sugerindo o nome *Zymonema brasiliensis* ao agente etiológico da paracoccidioidomicose em 1912 (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. Outros nomes foram criados 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 dentro do Reino Fungi – *Paracoccidioides*, revalidando a espécie *brasiliensis* criada anteriormente por Splendore. A partir de 1930, os estudos sobre a paracoccidioidomicose se intensificaram, devido a vários fatores como os avanços da imunologia, o aparecimento de drogas para o tratamento da doença, descoberta do dimorfismo do fungo que passou a ser analisado também pela microscopia eletrônica – possibilitando melhor compreensão de sua biologia celular (LACAZ, 1994). O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin (Colômbia) e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (VALLE & COSTA, 2001).

Duas espécies são consideradas agentes etiológicos da paracoccidioidomicose: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Ambos são fungos dimórficos que sofrem uma transição da forma miceliana para a forma de levedura quando se encontra à 37 ºC *in vitro* e em tecidos infectados (TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013). O processo de interconversão entre essas formas pode ser controlado *in vitro* por alteração da temperatura de incubação (SAN BLAS, 1993; SAN BLAS et al., 2002), sendo esta definida como uma condição essencial para induzir o dimorfismo (RESTREPO & JIMENEZ, 1980; SAN BLAS & SAN BLAS, 1985). Em meio mínimo, fatores nutricionais como a presença de cisteína (enxofre orgânico) e compostos sulfídricos (β-mercaptoetanol) também são importantes durante o processo de transição dimórfica (MEDOFF et al., 1987). Essas características tornam esses fungos excelentes modelos para abordagem molecular do processo de diferenciação celular de fungos dimórficos.

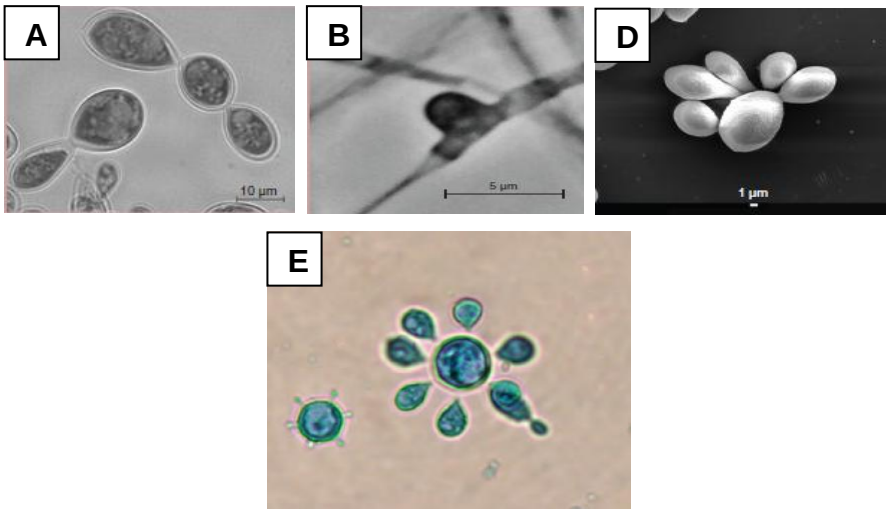

Figura 1. Célula leveduriforme do isolado *P. brasiliensis* Pb18. A) Células da levedura com múltiplos brotamentos observadas no microscópio de luz; **B** Hifa do Pb18 com conídeo em formação. **C)** Célula da levedura com múltiplos brotamentos observada por microscopia eletrônica; **D)** Aparência de "roda de leme" da levedura do *P. brasiliensis* isolado Pb18 proveniente de cultura à 37 ºC, observada por microscopia com azul de lactofenol (Adaptado de: CANO et al., 2012; BOCCA et al., 2013).

A forma miceliana apresenta uma organização pluricelular formada por filamentos de células cilíndricas com ramificações, que são denominadas hifas. Estas por sua vez são multicelulares, finas e septadas, podendo ter esporos terminais ou intercalares. As células de levedura são multinucleadas, arredondadas e exibem múltiplos brotamentos que conferem ao fungo uma estrutura típica usada inclusive para diagnóstico, denominada por Furtado e colaboradores (1967) de "roda de leme" (Figura 1). As mudanças morfológicas que acontecem na transformação de levedura para micélio são acompanhadas pelo alongamento dos brotamentos da levedura, desenvolvendo uma hifa (SAN BLAS, 1985; SAN BLAS & SAN BLAS, 1985; SAN BLAS et al., 2002). Segundo Bocca e colaboradores (2013), a posição sistemática do *Paracoccidioides* é:

Reino	*Fungi*
Filo ou Divisão	*Eumycota*
Subdivisão	*Deuteromycotina*
Classe	*Hyphomycetes*
Ordem	*Onygenales*
Família	*Ajellomycetaceae*
Gênero	*Paracoccidioides*
Espécie	*brasiliensis/lutzii*

A distribuição geográfica está relacionada com o clima. A maioria dos casos ocorre em lugares com vegetações tropicais e subtropicais, onde existe solo ácido, temperaturas entre 12 e 30 ºC, altitudes variando entre 150 e 2000 m, e índice pluviométrico entre 1000 e 4000 mm/ano (ALMEIDA, 1930; RIVITTI & AOKI, 1999). A PCM é considerada uma micose restrita ao continente americano, sendo circunscrita aos países latino-americanos (GREER & RESTREPO, 1977), onde se distribue de forma heterogênea mesmo nas áreas consideradas endêmicas (WANKE & LONDERO, 1994). A PCM ocorre na maioria dos países Latinos Americanos, com maior incidência no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (BRUMMER et al., 1993). É uma doença endêmica que percorre desde o México até a Argentina, sendo que 80% dos pacientes diagnosticados são encontrados no Brasil (BUENO, et al., 2016).

A PCM causa significante impacto socioeconômico nos países latino-americanos, pois afeta trabalhadores rurais no período produtivo da vida (DEL NEGRO et al., 2000). Indivíduos que exercem atividades agrícolas constituem a maior fração dos pacientes com a micose ativa, mas a infecção, que era praticamente rural, vem atingindo zonas urbanas, especialmente nas rotas usadas por trabalhadores migrantes entre zona rural e urbana. Assim, pode atingir todas as profissões, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros (LACAZ, 1991; RESTREPO, 1985; McEWEN, et al., 1995). O tratamento é geralmente longo e difícil, sendo necessária hospitalização dos pacientes, além de ser considerado de alto custo. Sequelas também são comuns, causando frequentemente disfunção pulmonar, sérias deformações dermatológicas e outras disfunções (FRANCO et al., 1994). A importância da PCM na saúde pública deve-se aos custos sociais e econômicos decorrentes não apenas da doença em atividade, que afeta indivíduos em fase produtiva, como também das frequentes sequelas secundárias a essa micose, motivo comum de incapacitação para o trabalho.

Os trabalhadores rurais são os mais atingidos, principalmente aqueles que trabalham com atividades relacionadas ao solo e à agricultura (RESTREPO, 1985). No Uruguai a micose é reconhecida como uma doença tipicamente ocupacional, ocorrendo apenas em madeireiros (CONTI-DIAZ et al., 1989; WANKE & AIDÊ, 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Blotta e colaboradores (1999) demonstraram que o Brasil é o país onde se registra o maior número de casos da PCM, com estimativa da incidência anual de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes e mortalidade de 0,14:100.000 habitantes (LAZERA et al., 1998). No Brasil há incidência da doença em vários estados, somando 80% dos casos conhecidos e sendo a maioria descrita no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. Embora acreditasse que a PCM era rara na Amazônia, testes realizados no Pará (1988) e Rondônia (1994)

mostraram alta prevalência de infecção nessa região, demonstrando que a mesma poderia vir a ser uma importante zona endêmica. Simultaneamente, verificou-se o crescimento do número de pacientes diagnosticados com PCM na última década no Hospital de Doenças Infecto Contagiosas (HDIC), em Teresina, Piauí. Em dezembro de 1994, 115 casos de PCM foram diagnosticados no HDIC, incluindo a Amazônia como zona endêmica para esta micose. A ruralização, o desmatamento e o revolvimento do solo em regiões onde o fungo é nativo seriam as causas do aumento de casos de PCM em determinadas regiões (WANKE, 1999).

A PCM que ocorre nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins colonizados nas últimas décadas, apresenta uma peculiaridade interessante: a alta prevalência dos casos registrados em crianças, comparecendo em percentuais duas a três vezes maiores do que os observados em outras regiões endêmicas do país. Isso ocorre devido às atividades das crianças em áreas limitadas e permanência duradoura das famílias em tais regiões (FONSECA et al., 1999).

O Brasil é considerado centro endêmico, representando 80% dos casos relatados, sendo os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso os mais afetados. Acometendo principalmente a população rural, a PCM é a oitava causa de morte no Brasil considerando-se as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas. No Paraná, onde é diagnosticada em quase todo o estado, corresponde à quinta causa de óbitos por doença dessa natureza e é onde está registrada a maior taxa de mortalidade por PCM do Sul e Sudeste (COUTINHO et al., 2002). Em áreas classificadas como altamente endêmicas, a razão de incidência anual da PCM é estimada em 3/100.000 habitantes (RESTREPO et al., 2001). Dentre todas as micoses, a PCM é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, com a maior taxa de mortalidade dentre as micoses sistêmicas no Brasil (PRADO, et al., 2009).

As maiores taxas de mortalidade por 1.000.000 habitantes no Brasil são verificadas no Sul (2,59) e Centro-Oeste (2,35), seguidas, em ordem decrescente, pelo Sudeste (1,81), Norte (1,06) e Nordeste (0,20). As taxas mais elevadas são encontradas nos estados do Mato Grosso do Sul (4,39), Rondônia (3,65), Paraná (3,52) e Mato Grosso (3,22) (COUTINHO et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2005).

A inexistência de uma notificação compulsória dos casos de paracoccidioidomicose impede a existência de dados precisos sobre a gravidade da doença no Brasil. As informações disponíveis baseiam-se em relatos de inquéritos e de séries de casos. Testes de sensibilidade intradérmica com paracoccidioidina mostram níveis de cerca de 10% da população dos países mais afetados, enquanto dados estimam que a incidência anual em

áreas endêmicas chegue a três novos casos para cada 100.000 habitantes. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; COUTINHO et al., 2002; FAVA & FAVA-NETTO, 1998; WANKE & LONDERO, 1994).

Em casos graves, a letalidade é estimada entre 2 e 23%, alcançando 30% se associado à AIDS. Pela quantidade de morte prematura que provoca, principalmente em segmentos sociais específicos como os trabalhadores rurais, a PCM representa um grave problema de saúde pública no Brasil. Entre 1985 e 2005, ocorreram 1950 óbitos no estado de São Paulo, nos quais a PCM foi à causa da morte (SANTO, 2008).

Embora a rota de infecção já tenha sido estabelecida (inalação de propágulos do fungo via trato respiratório), o habitat do fungo continua sendo investigado. O *P. brasiliensis* no solo se apresenta como um micélio saprófito e a matéria orgânica em decomposição fornece os nutrientes necessários. Quando os propágulos infecciosos são inalados, são depositados nos pulmões humanos e o fungo passa para a forma de levedura devido à temperatura corporal, estabelecendo a doença (THEODORO et al., 2012).

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

O fungo foi isolado de tecidos de fígado, baço e pulmão de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados em uma região de densa floresta tropical no Pará (NAIFF et al., 1986). Já Bagagli e colaboradores (1998) relataram elevada incidência de PCM em tatus da mesma espécie em áreas endêmicas de Botucatu. O mesmo também foi demonstrado em Ibiá – Minas Gerais (VERGARA & MARTINEZ, 1999). Estes dados evidenciam que tatus dessa espécie são reservatórios naturais e hospedeiros silvestres do fungo. Borelli, em 1963, criou o termo *reservárea* para indicar o local exato onde o fungo vive, sendo que

quatorze reserváreas foram determinadas no Brasil (RESTREPO et al., 2001), localizadas no Pará, Rondônia, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, visto que apresentam verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos.

A doença é mais frequente em indivíduos do sexo masculino (80-90%) com idade entre 30 e 60 anos, afetando principalmente trabalhadores do meio rural e indivíduos imunocomprometidos. Em indivíduos do sexo feminino e em crianças a incidência é menor, chegando a uma taxa de homem:mulher de 78:1 casos (RESTREPO et al., 1984). Esta diferença parece estar relacionada a variações no perfil hormonal homem/mulher (LOOSE et al., 1983). Nicol e colaboradores, em 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 em camundongos fêmeas e em machos 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.

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

O tratamento da doença é normalmente prolongado, podendo durar até cinco anos. Atualmente, é feito à base de sulfas e/ou drogas antifúngicas, seguido de acompanhamento pós-terapêutico. As drogas frequentemente utilizadas são itraconazol, cetoconazol, sulfametoxazol, trimetroprim e anfotericina B, que apresentam eficiência significativa, mas severos efeitos colaterais. O sucesso da terapia depende tanto do antifúngico utilizado como do grau de disseminação das lesões e da capacidade imunológica do paciente. 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 doentes devem ser periodicamente examinados por meio de exames clínicos e complementares para avaliar se ocorreu ou não a regressão dos sintomas e desaparecimento das lesões ativas (PALMEIRO et al., 2005).

A PCM é adquirida pela inalação de esporos e não é transmitida de pessoa a pessoa, pois à temperatura corporal o fungo está na forma de levedura (RESTREPO-MORENO, 1993; Da SILVA et al., 2000; SOUTO et al., 2000). No hospedeiro, os esporos transformam-se em leveduras e passam a multiplicar-se por brotamento múltiplo. O fungo na sua 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. O sítio de infecção primária da PCM, o qual às vezes não é aparente, é o pulmão. Depois de instalado, o *P. brasiliensis* causa uma benigna e transiente infecção pulmonar ou oral em indivíduos normais. A infecção primária é quase sempre subclínica em indivíduos com o sistema imune normal. Se o hospedeiro torna-se imunodeprimido, 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).

A presença de febre é irregular e em geral pouco intensa. Seu surgimento pode ser decorrente de co-infecções bacterianas, tais como *Mycobacterium tuberculosis* ou outros microrganismos comuns. No pulmão o *P. brasiliensis* dá origem a manifestações clínicas de maneira muito insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispnéia aos esforços. As lesões da mucosa oral resultam de disseminação hematogênica a partir de um foco primário pulmonar. Na boca, nota-se uma estomatite moriforme, geralmente acompanhada por um conjunto de sinais e sintomas que incluem 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:

1) regredir, com a destruição do fungo e formação de cicatrizes estéreis;

2) regredir com permanência de fungos viáveis no interior das cicatrizes, formando focos quiescentes;

3) 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 apresenta-se sob duas formas clínicas diferentes, a infecção e a doença. Quando ocorre a infecção, esta é assintomática e ocorre frequentemente em indivíduos saudáveis que residem (ou residiram) em áreas endêmicas e que possuem reatividade ao teste de pele com paracoccioidina (RESTREPO-MORENO, 1993). Também são incluídos nesta forma clínica os indivíduos com lesões residuais inativas que contém *P. brasiliensis*.

Entretanto, a PCM doença é sintomática e, dependendo do seu curso, se divide em dois grupos - aguda ou crônica:

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

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

Após atingir os pulmões, o fungo pode disseminar-se via linfo-hematogênica, atingindo, com maior frequência, os linfonodos, mucosas, pele, glândula supra renais, e ainda, com menor frequência, a medula óssea, baço, fígado e o sistema nervoso central e outros órgãos (BERBERT et al., 2007; BORGES-WALMSLEY et al., 2002; MONTENEGRO & FRANCO, 2004). Em qualquer fase, histopatologicamente, a doença segue um padrão 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 um microabscesso bem delimitado. Em sequência, se os neutrófilos falham em destruir as células fúngicas, fagócitos mononucleares (macrófagos) chegam até a área de infecção e envolvem a zona supurativa central, engolfando os microrganismos e restos celulares. Nessa etapa, macrófagos ativados acumulam-se de forma coesa, adquirindo uma morfologia peculiar que caracteriza como “células epitelóides”. A presença de macrófagos ativados epitelóides em conjunto com a presença de linfócitos que regulam a resposta imune, e ainda com fibroblastos atraídos para a região de agressão e em seguida ativados por mediadores específicos, caracteriza então a formação de granulomas (KAMINAGAKURA et al., 2007; BRITO E FRANCO, 1994; MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Essa resposta adaptativa celular é usualmente eficaz na contenção da infecção, conforme observado pelo contraste entre a frequência de positividade para paracoccidioidina e o número de doentes. Os granulomas são usualmente 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, produzir 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 disseminar em outros órgãos e tecidos.

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

Na PCM, a imunidade inata e específica são mecanismos utilizados pelo hospedeiro no combate ao *P. brasiliensis*, sendo que a imunidade celular é a principal defesa contra o fungo (CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2000; DINIZ et al., 2004; BOZZI et al., 2004; BOZZI et al., 2006). Na imunidade inata, os fagócitos têm importante papel na defesa dos hospedeiros, uma vez que *P. brasiliensis* é um micro-organismo intracelular facultativo (RESTREPO-MORENO, 1993; CALVI et al., 2003). Demonstrou-se *in vitro* que esse fungo é fagocitado por macrófagos que apresentam efeitos fungicidas para o mesmo sendo necessários para sua eliminação (POPI et al., 2002). Em células humanas, macrófagos tratados com IFN-γ recombinante ou com citocinas de sobrenadante de células mononucleares estimuladas com concanavalina A restringiram a replicação do fungo, mas

perderam a atividade fungicida (CALVI et al., 2003). Para uma eliminação efetiva do fungo por monócitos, é necessário um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN-γ para estimular as células a produzirem TNF-α que poderá estar envolvido, por meio de uma via autócrina, na fase final do processo de ativação (CALVI et al., 2003). Além disso, o IFN-γ ativa os macrófagos para produzirem óxido nítrico (NO), o qual inibe a transformação de *P. brasiliensis* de conídio para levedura (GONZALEZ et al., 2000).

Muitas pessoas são expostas ao fungo, mas apenas um pequeno número desenvolve os sintomas clínicos, sugerindo que ambos os sistemas (inato e adaptativo) são importantes no controle do fungo (MUSATTI et al., 1994). A imunidade mediada por células é geralmente mais significativa que a imunidade humoral, e macrófagos são importantes na defesa. Essa importância já foi retratada em sistemas murinos, pois a ingestão de leveduras do fungo permite que as mesmas multipliquem-se no interior de macrófagos peritoneais e alveolares (BRUMMER et al., 1989). Além disso, a imunidade mediada por células é um fator mais significante que a imunidade humoral, e a ativação de macrófagos parece promover a mais importante linha de defesa. Considerando a patogênese da paracoccidioidomicose, os estágios iniciais são extremamente importantes, principalmente quando macrófagos residentes do pulmão interagem com o fungo pela primeira vez e tornam-se ativados (SOARES, et al., 2010).

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

O TNF-α atua nas funções de macrófagos tanto na PCM humana quanto na experimental, modulando e amplificando a resposta imune, ao promover uma reação granulomatosa e atividade fungicida mediada pelos macrófagos. A ausência dessa citocina resulta na perda de mecanismos de defesa associados com a inabilidade de desenvolver uma reação granulomatosa, que é efetiva para conter a multiplicação do fungo (SOUTO et al., 2000; FORTES et al., 2011). A falta de ativação de macrófagos por IFN-γ na PCM crônica pode levar a incapacidade de monócitos/macrófagos para controlar a infecção. Dessa forma, destruir o fungo *in vivo* dependerá do balanço de fatores inibitórios e estimulatórios nas células efetoras (CALVI et al., 2003). O balanço de citocinas pró e anti-

inflamatórias produzidas por macrófagos durante o processo infeccioso é capaz de determinar a progressão da doença ou a morte do fungo (SIQUEIRA et al., 2009).

A resposta inflamatória contra fungos serve para limitar a infecção, mas também contribui com a patogenicidade, como já foi documentado em pacientes com graves infecções fúngicas. As funções antifúngicas efetoras dos fagócitos incluem destruição e inibição do crescimento do fungo. Esses fagócitos apresentam atividade intrínseca contra os fungos, e esta atividade pode ser aumentada por opsoninas e citocinas derivadas de células T, indicando que os sistemas imunes inato e adaptativo trabalham de maneira dependente, e são regulados de maneira recíproca (ROMANI, 2004).

Macrófagos alveolares residentes nos alvéolos dos pulmões são a primeira linha de defesa contra patógenos pulmonares, sendo críticos na defesa do hospedeiro em tecidos pulmonares (FELS & COHN, 1986).

Tradicionalmente considerada como primeira linha de defesa, a imunidade inata está recebendo bastante atenção, visto que apresenta uma importante distinção, capaz de distinguir o “próprio” do “não próprio” além de ativar os mecanismos da imunidade adaptativa por meio de sinais específicos (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997). Confere, então, um rápido reconhecimento dos patógenos infecciosos, por meio de um repertório limitado de receptores, que reconhecem padrões moleculares conservados dos patógenos (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002; ROEDER et al., 2004).

Os macrófagos pertencem ao sistema de fagócitos mononucleares pertencentes a uma família de células que tem uma linhagem comum, que se originam da medula óssea, circulam no sangue como monócitos e quando estabelecidos nos tecidos, essas células amadurecem e se tornam macrófagos. O fenótipo desses macrófagos depende diretamente do ambiente em que se encontram (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005; GEISSMANN et al., 2010). São células versáteis, capazes de responder a diferentes estímulos do ambiente e possuem um fenótipo heterogênio, como resultado da diferenciação celular e resposta a diversos estímulos endógenos e exógenos. Dessa forma, possuem papel importante na percepção de patógenos, secreção de citocinas e mediadores inflamatórios e apresentam antígenos as células T (GORDON, 2003; FOLDI et al., 2010).

Macrófagos são consideradas células indispensáveis ao sistema imune com funções decisivas tanto na imunidade inata quanto adaptativa, macrófagos residentes promovem defesa imediata contra patógenos e coordenam a infiltração leucocitária. Participam do processo de fagocitose e degradação de células apoptóticas, microrganismos e células neoplásicas (GORDON, 2003). A ativação de macrófagos pode ser pró-inflamatória ou anti-inflamatória, contribuindo para a destruição do tecido ou regeneração. E também são

importantes no direcionamento da resposta imune adaptativa, influenciando no fenótipo das células T que veriam de acordo com os sinais emitidos (MANTOVANI, et al., 2005).

Durante o processo inflamatório, os macrófagos exercem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos inflamatórios diferem dos macrófagos residentes especialmente pelo aumento da capacidade fagocítica e pela habilidade aumentada de gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005). As citocinas e produtos microbianos afetam diferentemente a função destas células ativando ou desativando-as (MANTOVANI et al., 2004).

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

Macrófagos são considerados células fagocíticas “profissionais”. Fagócitos profissionais se diferem dos fagócitos não profissionais de acordo com a alta efetividade de fagocitose que promovem, além da expressão de receptores na superfície capazes de detectar sinais que normalmente são encontrados em tecidos saudáveis (MANTOVANI et al., 1972; WAGER & WORMLEY, 2014).

Além disso, macrófagos teciduais existem em maior número do que as células dendríticas, podendo assim exercer um importante papel regulador da imunidade inata. A atividade fungicida de macrófagos mostrou-se mediada pela produção de óxido nítrico, bem como pela depleção de metabólitos fundamentais para o crescimento de fungos (GONZALEZ et al., 2004; CANO et al., 1994; BRUMMER et al., 1988; BRUMMER et al., 1989). Os macrófagos desempenham papel crítico na imunidade inata, fagocitando partículas estranhas e produzindo citocinas. Atuam também como importantes células acessórias e efetoras na imunidade adquirida, apresentando antígenos aos linfócitos T (METZER, 2000; FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005).

As citocinas produzidas pelos macrófagos dependem do tipo de polarização que estas células adquirem (M1/M2), o que define as funções distintas das populações de macrófagos, em resposta a fatores que dominam o cenário inflamatório (MARTINEZ, et al., 2008), conforme pode ser observado na figura 2. Essa polarização de macrófagos foi observada por Gordon e colegas que submeteram macrófagos à IL-4 ou IL-13 e elucidaram uma “ativação alternativa” com fenótipos distintos à ativação clássica de macrófagos (GORDON, 2003).

Macrófagos ativados pela via clássica, chamados M1, em geral produzem níveis elevados de IL-12 e baixos níveis de IL-10, participando como indutores e efetores de resposta imune Th1. São ativados pelos ligantes dos receptores TLR e interferon γ (MURRAY & WYNN, 2011). Essas células apresentam, ainda, atividades citotóxicas, resultado de sua capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido) e pró-inflamatórias, com liberação de citocinas TNF, IL-1 e IL-6 (MANTOVANI et al., 2004). Essas células têm sido denominadas de macrófagos M1 provenientes de linhagens de camundongos Th1 (C57BL/6 e B10/A), a exemplo da nomenclatura dos linfócitos Th1 (MILLS et al., 2000; MANTOVANI et al., 2002; BASTOS et al., 2002; MOSSER, 2003). Moléculas presentes na parede dos fungos, como β-glucana e zymosan são capazes de estimular a produção de ROS em macrófagos via dectina-1. Os CLRs medeiam proteção contra diversas infecções fúngicas, incluindo *Coccidioides*, *Pneumocystis* e *Candida*. Reconhecimento do fungo por dectina-1 em macrófagos permite a produção de ROS dependente de dectina-1, ao contrário da dectina-2 que está relacionada com citocinas Th17 (UNDERTHIL, et al., 2005; SAIJO, et al., 2010; ROBINSON, et al., 2009).

Durante uma resposta a um dano, citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-4 e IL-13, aumentam e induzem a polarização para macrófagos com fenótipo M2. Mediadores distintos foram reportados como inibidores do desenvolvimento de células M1, atribuindo propriedades antiinflamatórias aos macrófagos, os quais são coletivamente designados M2, provenientes de uma ativação alternativa. Células M2 referem-se a várias formas de ativação de macrófagos, incluindo aquelas após exposição a IL-4 e IL-13, e também a complexos imunes, IL-10 ou glicocorticóides (GORDON, 2003). Geralmente, células M2 produzem níveis reduzidos de citocinas inflamatórias, secretam moléculas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF-β, e induzem resposta imune Th2 (MANTOVANI et al., 2004). Essas células têm sido denominadas de macrófagos M2, provenientes de linhagens de camundongos Th2 (BALB/c eDBA/2).

A presença de macrófagos com fenótipo M2 em indivíduos saudáveis (na placenta, pulmões e sítios imunes) bem como em doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatóide, aterosclerose), sugere que essas células exercem proteção contra danos da resposta imune devido à elevada produção de fatores envolvidos na remodelação tecidual, aumento da atividade de fibroblastos (SONG et al., 2000) e promoção de angiogênese (KODELJA et al., 1997).

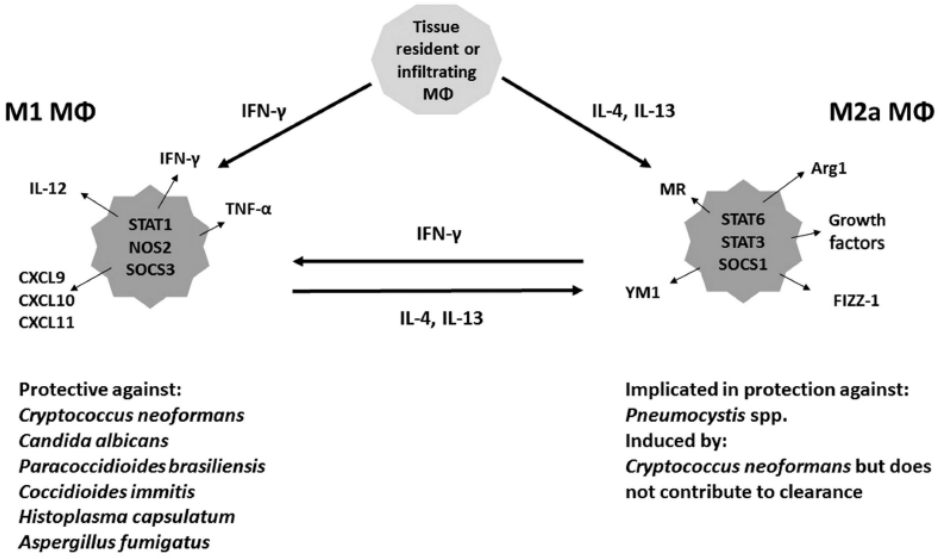

Figura 2. Ativação de macrófagos durante infecção pulmonar por fungo, evidenciando a plasticidade. Macrófagos M1 são ativados na presença de IFN-γ produzidos por células Th1. Esses macrófagos têm atividade microbicida com produção de espécies reativas de oxigênio. Macrófagos M2a dependem da produção de IL-4 e IL-13, induzem uma resposta imune do tipo Th2 (Adaptado de: WAGER & WORMLEY, 2014).

A interação entre moléculas de superfície do fungo e receptores presentes na membrana celular das células fagocíticas, como macrófagos, modula a fagocitose e a ativação dessas células. Esses receptores são conhecidos como PRRs que são capazes de reconhecer os PAMPS. Os PRRs conhecidos são os receptores do tipo Toll (TLR), receptores de Lectina do tipo C (CLR) e proteínas da família da galectina. Esses receptores em fagócitos iniciam uma série de eventos intracelulares que promove a ativação do sistema imune e a morte do fungo, com uma reposta imune específica que depende do tipo de célula envolvida. Monócitos, macrófagos e neutrófilos contribuem na resposta imune inata antifúngica por meio da fagocitose e morte direta do patógeno (ROMANI, 2011).

Os membros da família dos CLRs incluem Dectina-1 (CLEC7A) e Dectina-2 (CLEC4E), receptor de manose, langerina (CLEC4K), lectina ligada a manose e DC-SIGN. Dectina-1 reconhece β-glucanas e promove a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias. Já dectina-2 reconhece estrutura de manose e possui maior afinidade com hifas do que com leveduras, sua ativação permite o emparelhamento com receptor Fcγ e induz citocinas pró-inflamatórias. Sabe-se que camundongos deficientes em dectina-2 apresentam maior suscetibilidade a infecções fúngicas por *Candida albicans*, mas não à *Criptococcus neoformans*. (ROMANI, 2011). Os CLRs são centrais no reconhecimento de fungos e na indução da resposta imune inata e adaptativa, e indivíduos com deficiência genética nos CLRs são mais suscetíveis à infecções fúngicas. Os receptores de manose e DC-SIGN

reconhecem mananas, e ambos os receptores podem direcionar os antígenos manosilados dos fungos por meio de uma sinalização endocítica, promovendo o processamento do antígeno e apresentação para células T (LAM, et al., 2007; CAMBI, et al., 2008). Entretanto, os receptores de manose também tem afinidade por α-glucana e quitina e atuam em colaboração com os TLRs, dectina-1.

A família dos receptores do tipo Toll é a classe de PRRs melhor caracterizada em espécies de mamíferos. Esses receptores são peça fundamental na resposta inata e na consequente ativação da resposta adaptativa (HERTZOG, 2008). Após o reconhecimento dos PAMPs, TLR inicia a cascata de sinalização, por meio da molécula adaptadora MyD88 e/ou TRIF, sendo esta molécula recrutada e capaz de ligar-se ao domínio TIR do TLR, permitindo, o recrutamento e a ativação das kinases (IRAKs) resultando então na ativação de fatores de transcrição como NF-κB, AP-1, IRF3 e IRF7, e consequentemente na produção de citocinas pró-inflamatórias e INF-γ (O'NEILL & BOWIE, 2010; LIEW et al., 2005). A regulação apropriada resulta na resolução do foco primário de inflamação; entretanto, a resposta inapropriada leva à sepse, inflamação crônica, doenças autoimunes e câncer (LIEW et al., 2005; HERTZOG, 2008). Dessa forma, a regulação da sinalização via TLR é extremamente importante para o controle da resposta inflamatória, pois pode promover a ativação de genes envolvidos em citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF-α, IL-6, IFN do tipo I (α e β) e do tipo II (γ), e citocinas imunorreguladoras como IL-12 e IL-10.

A ligação dos polissacarídeos da parede celular do fungo e também ácidos nucleicos é capaz de ativar os receptores do tipo Toll (TLR). Esses receptores conseguem detectar múltiplos PAMPs, incluindo lipopolissacarídeo - LPS (detectado por TLR 4), lipoproteína bacteriana e ácido lipoteicóico (detectado por TLR 2), flagelina (detectado por TLR 5), DNA de bactérias e vírus (detectado por TLR 9). Ativação de macrófagos via TLR permite a produção de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6 e IL-12, regulando também a diferenciação celular.

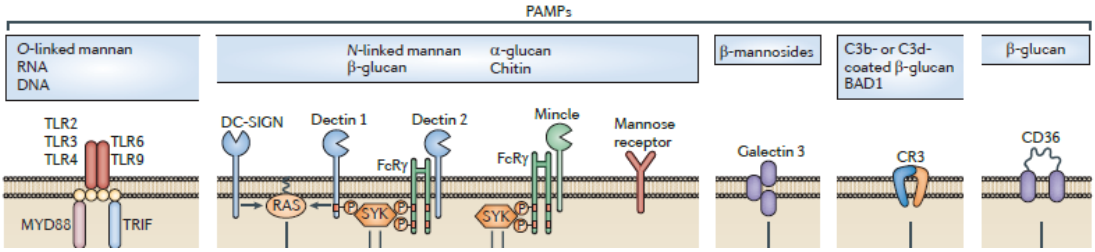

Figura 3. Esquema dos receptores de reconhecimento na resposta imune inata contra fungos. Receptores de reconhecimento padrão presentes na superfície de células fagocíticas, como macrófagos, que reconhecem estruturas fúngicas (PAMPs). Há os receptores da família TLR (TLR 2, 3, 4, 6, 9), Dectina 1 e 2, receptor de manose, DC-SIGN, Mincle, entre outros. A ativação destes receptores leva à ativação da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fagocitose (Adaptado de: ROMANI, 2011).

Os TLRs fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos evolutivamente conservados que contém um domínio externo à membrana com sequências ricas em leucina, particular para cada TLR (GAY & KEITH, 1991). Foram identificadas 11 proteínas em mamíferos, sendo que para os humanos foram descritos 10 desses receptores até o momento (TRINCHIERI & SHER, 2007). Dentre as estruturas reconhecidas pelos TLRs além do LPS, estão peptideoglicanas (PGN), âncoras de glicofosfatidil inositol (GPIs) (presente em protozoários), zimozan (presente em fungos), RNA dupla fita (comum em vírus), flagelina (presente em bactérias flagelares), e sequências de DNA ricas em CpG não metilados (presentes em vírus e bactérias). (TRINCHIERI & SHER, 2007; KAISHO & AKIRA, 2002).

Após o reconhecimento de estruturas microbianas pelos TLR, esses receptores sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras como MyD88, TIRAP, TRAM e SARM (O'NEIL & BOWIE, 2007; SHIMAZU, et al., 1999; KALIS, et al., 2003). O tipo de sinalização depende do uso seletivo de diferentes combinações de moléculas adaptadoras. As ativações dependentes da molécula MyD88 – uma molécula compartilhada por quase todos os TLRs – é iniciada com a facilitação da associação da MyD88 com a IRAK4 o que favorece a fosforilação de IRAK1. A fosforilação da IRAK1 permite a ligação da molécula TFAF6 ao complexo. A ligação de TRAF6, por sua vez, ativa TAK1 que faz um complexo IKK que leva a ativação de NF-kB. Simultaneamente, TAK1ativa dois membros da família MAP kinases que subsequentemente ativam JUN N-terminal kinase (JNK) e p38, induzindo a produção de citocinas inflamatórias. No caso dos receptores TLR 7, TLR 8 e TLR 9 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 TLR 2 e TLR 4 necessitam, além da MyD88, da molécula adaptadora TIRAP. Os TLR3 e TLR 4 são capazes de ativar NF-kB por uma via independente de MyD88 e dependente de TRIF (O'NEILL & BOWIE, 2007). A molécula adaptadora TRIF tem diferentes regiões de interações que permitem o recrutamento de diferentes moléculas efetoras como TBK1, TRAF6 e RIP1. A interação entre TRIF, TRAF6 e TBK1 faz com que TRAF6 ative NF-kB, além de promover a fosforilação de IRF3, levando à produção de IFN do tipo I. A interação de TRIF com TLR 3 ocorre diretamente, já os TLR 4 necessitam da participação da molécula TRAM (conforme esquema observado na figura 4).

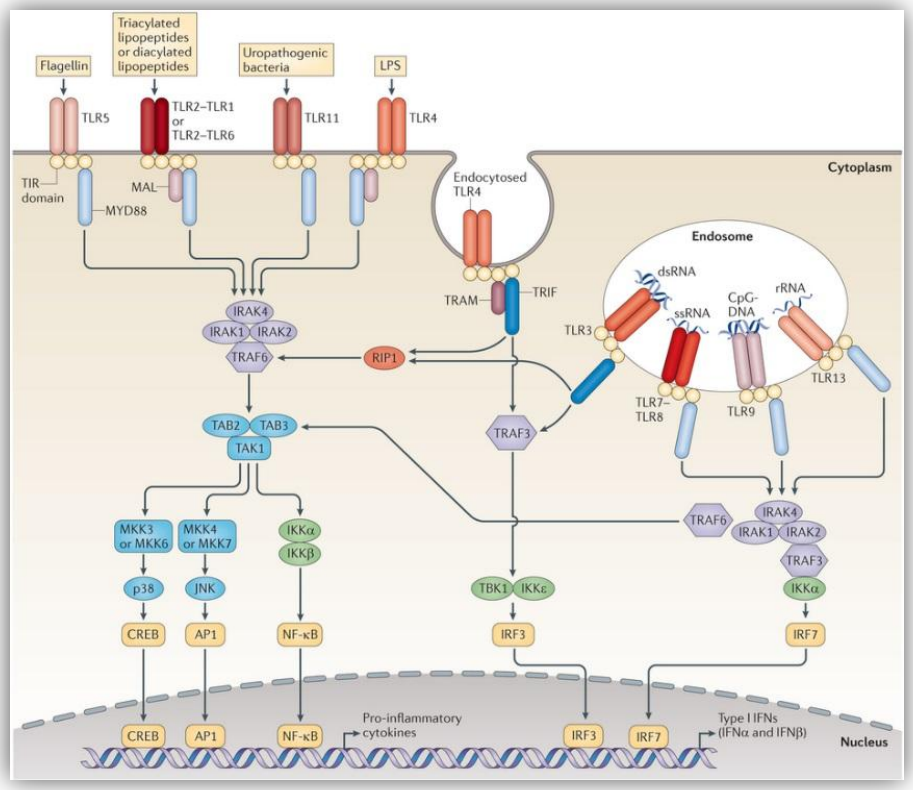

Figura 4. Representação esquemática da cascata de sinalização mediada pelos receptores da família TLR. (Adaptado de: O'NEILL et al., 2013).

Em 2012, Netea e colaboradores descreveram pela primeira vez o uso de TLRs por um patógeno fúngico, *Candida albicans*. Camundongos C3H/heJ (os quais possuem um defeito na expressão do gene de TLR 4), apresentaram uma deficiência no recrutamento de neutrófilos ao sítio de infecção e suscetibilidade na disseminação do fungo quando comparado com camundongos controle (C3H/HeN). As quimiocinas provenientes de queratinócitos e a proteína de macrófaos inflamatórios (MIP-2) estão em menor concentração nos macrófagos provenientes dos camundongos com defeito no TLR 4.

Os TLRs podem atuar em sinergia, favorecendo a ativação celular (TRINCHIERI & SHER, 2007). Por exemplo, TLR 4 e TLR9 podem exercer efeitos similares, utilizando vias distintas (KAISHO & AKIRA, 2002). Ambos podem ativar vias dependentes de MyD88, que essencialmente ativam IRAK e TRAF6 e levam à ativação de NF-kB e MAPK. Da mesma forma, ambos induzem a regulação positiva de moléculas co-ativadoras e moléculas co-estimulatórias de linfócitos. O interessante neste caso é que enquanto a indução feita por TLR 4 é independente de MyD88, a indução por TLR9 se dá por via dependente de MyD88

O TRL 4 humano foi o primeiro TLR caracterizado em mamíferos, sendo expresso em macrófagos e células dendríticas. Funciona como receptor de transdução de sinal para LPS, o que foi confirmado em camundongos CH3/HeJ deficientes em TLR 4, os quais não apresentavam respostas ao estímulo por LPS (MEDZHITOV, 2001). O reconhecimento de LPS pelo receptor é complexo e requer várias moléculas acessórias. Além do CD14, a

proteína MD-2, expressa na superfície celular associada ao TLR 4, também é importante no reconhecimento ao LPS (VISINTIN et al., 2006). Estudos comparativos de suscetibilidade *in* vivo entre cepas diferentes de *P. brasiliensis* durante infecção intraperitoneal demonstraram que camundongos TLR 4 deficientes (C3H/HeJ) são mais resistentes que os camundongos controle (C3H/HePas) (CALICH et al., 1985). Entretanto, macrófagos provenientes de camundongos TLR 4 deficientes possuem menor capacidade fagocítica, secretam menores níveis de NO, IL-12, mas produzem níveis normais de TNF-α e há aumento de produção de IL-10. Resultados *in vitro*, após 96h de infecção pulmonar, demonstraram que camundongos TLR 4 deficientes possuem menor carga fúngica e menor produção de citocinas pró-inflamatória (LOURES, et al., 2010).

Em relação ao TLR 2, este receptor tem-se mostrado envolvido no reconhecimento de vários produtos microbianos, incluindo peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, paredes celulares de fungos, dentre outros (KAWAI & AKIRA, 2005). O TLR 2 pode exercer sua ação em cooperação com outros dois receptores: TLR 1 e TLR 6. Apesar disso, estes dois últimos são expressos em vários tipos celulares, enquanto a expressão de TLR 2 parece ser restrita a células apresentadoras de antígeno e células endoteliais (MUZIO et al., 2000). TLR 2 apresenta efeito protetor em modelos de infecção por *Candida albicans*, entretanto, resultados conflitantes também foram descritos devido a diferenças dos protocolos experimentais (NETEA, et al., 2004; VILLAMON, et al., 2004). O efeito deletério da sinalização de TLR 2 durante a infecção está associada com o aumento da síntese de IL-10 e aumento da sobrevivência de células T reg $CD4^{+}CD25^{+}$, o que resulta numa deficiência da imunidade mediada por células T e aumento da carga fúngica (NETEA, et al., 2004). Estudos demonstraram que em camundongos TLR 2 deficientes ocorre aumento de resposta do tipo Th17 associada com diminuição da expansão de células T reg (LOURES, et al., 2009). Em adição, uma infecção grave por *P. brasiliensis* está associada com aumento da produção de citocinas do tipo Th17, aumento da imunidade pró-inflamatória, e expansão de células T; tudo isso influenciado por TLR 4 (LOURES, et al., 2009; CALICH, et al., 2008; LOURES, et al., 2010; LOURES, et al., 2011).

Segundo Shishido e colaboradores (2006), ativação de TLR 2 tem papel central na regulação da inflamação vascular em camundongos, sugerindo que TLR 2 induz aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6) e de espécies reativas de oxigênio. TLRs também podem ser ativados por moléculas de outros tecidos, como as do sistema cardiovascular, apresentando um elo entre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e o sistema imunológico (FRANTZ et al., 2007).

A capacidade de sinalização dos TLRs pode ser modulada pelo IFN-γ, amplificando esta capacidade por regular positivamente as moléculas de sinalização dos receptores.

Além disso, o IFN-γ aumenta a expressão do TLR, dos co-receptores e das moléculas acessórias como Myd88, IRAK1 e TRAF6, com consequente aumento da ativação do NF-κB (SCHORODER et al., 2006). A ativação de TLRs em células apresentadoras de antígenos permite a expressão de IL-12 e subsequente ativação de células Th1 produtoras de IFN-γ Interessantemente, a falta da produção de IL-12 por meio de ativação limitada de TLR durante a resposta inflamatória/imune induz uma resposta do tipo Th2, sugerindo que esse tipo de resposta é um "defeito" da sinalização que ocorre na ausência de IL-12. TLRs e CLRs induzem MHC-II, moléculas co-estimulatórias e expressão de citocinas por células apresentadoras de antígenos, induzindo assim, a diferenciação das células T. No pulmão, macrófagos inflamatórios e células dendríticas são essenciais na apresentação de antígenos aos linfócitos.

Além dos receptores da resposta imune inata, um novo receptor vem recebendo atenção, capaz de influenciar na resposta imune e inflamatória de macrófagos, assim como, na diferenciação de células T. São esses os receptores do tipo Notch.

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

A comunicação celular mediada pelo receptor Notch é essencial para a geração correta e direcionamento das células e dos tecidos. A caracterização inicial de Notch em *Drosophila* por Donald Poulson permitiu verificar que a ausência da atividade de Notch em embriões causou hiperplasia no tecido neuronal, um fenômeno conhecido como "neurogênico" e depois se verificou ser uma característica dos mutantes de *Drosophila*. Esse achado permitiu classificar a cascata de sinalização Notch com uma definição genética, em que Notch interage com genes neurogênicos importantes na formação do sistema nervoso. Entretanto, Poulson notou que os mutantes do gene Notch também apresentavam outros defeitos na formação do embrião e dos tecidos, indicando que essa via de sinalização não estava apenas envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso, mas também na maioria das decisões celulares importantes no desenvolvimento do animal. Hoje, sabe-se que Notch participa de diversos sistemas e diversas decisões celulares, não apenas de *Drosophila*, mas também de outros reinos (FIOR & HENRIQUE, 2009).

A ativação da sinalização Notch ocorre mediante contato célula-célula, como resultado da interação entre o receptor Notch e seus ligantes (Delta ou Jagged). Ao analisar em nível molecular, essa interação induz duas clivagens proteolíticas sucessivas. A primeira clivagem ocorre no domínio extracelular mediada pela metaloprotease da família ADAM e a segunda clivagem ocorre no domínio da transmembrana e é mediada pela γ-secretase. Esta segunda clivagem permite a liberação e a translocação do NICD em direção ao núcleo, atuando como co-ativador transcricional. O NICD não consegue se ligar diretamente ao DNA, mas é capaz de se ligar a proteína RPB-J ou CSL e então ativar a transcrição dos genes alvos dessa via. Quando o NICD liga-se ao CSL juntamente com o co-ativador *Mastermind* e acetiltransferases de histonas formam um complexo transcripcionalmente ativo (KOVALL, 2008). Este complexo é capaz de ativar a expressão de genes da família *Hes* e *Hey* que funcionam como inibidores da sinalização Notch. Além dos membros da família *Hes* e *Hey*, existem vários genes implicados diretamente em várias neoplasias, que são sobre expressos como consequência direta da sinalização Notch dependente de CSL (FISCHER & GESSLER, 2007). Entretanto, na ausência de Notch, o RBP-J ou CSL recruta um complexo co-repressor capaz de reprimir a transcrição dos genes alvos de Notch. Essa sinalização não utiliza mensageiros secundários, e a atividade é dependente da concentração nuclear do NICD. (Figura 4).

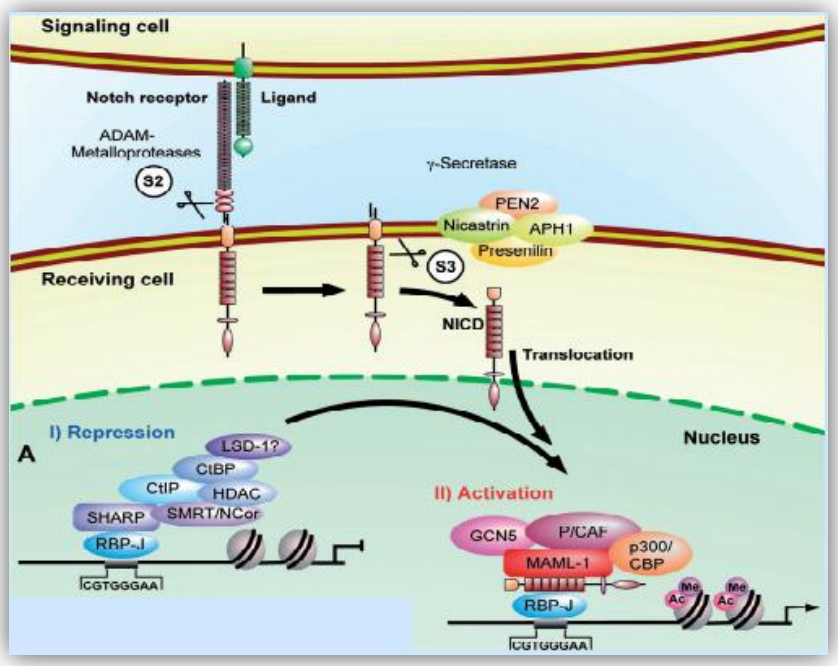

Figura 5. Sinalização Notch. Interação dos receptores de Notch com seus ligantes, que inicia uma cascata de clivagens enzimáticas no receptor pela família das proteinases ADAM e pelo complexo γ-secretase, que permite a liberação e translocação do NICD em direção ao núcleo. No núcleo, o NICD se associa ao fator de transcrição RPBJ (ou CSL), e ativa a transcrição ao ligar-se ao sítio de ligação do DNA. I) Repressão dos genes alvos de Notch. Na ausência da sinalização Notch, o RBP-J recruta um complexo de co-repressores capaz de reprimir a transcrição dos genes alvos de Notch. (II) Ativação dos genes alvos de Notch. O NICD interage com o RBP-J recrutando um complexo de co-ativadores, promovendo a transcrição dos genes alvos da via (Adaptado de: BORGREFFE & OSWALD, 2009).

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

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

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

Estudos vêm demonstrando que a sinalização Notch participa no desenvolvimento, maturação, ativação e transformação de linfócitos (WENG & ASTER, 2004; MAILLARD et al., 2003; WENG. et al., 2004). No entanto, a sinalização Notch pode também influenciar a diferenciação das células mielóides (CARLESSO et el., 1999; DELANEY et al., 2005) e o

papel dessa via permanece indeterminado em macrófagos e em muitas outras doenças (AIKAWA & LIBBY, 2004).

A sinalização Notch pode ser ativada em macrófagos *in vivo* por meio de ligantes de Notch, estes sendo expressos de maneira constitutiva ou indutiva em macrófagos, e também por ligantes de Notch expressos em outras células, como células epiteliais do sítio inflamatório (HU et al., 2008). Os ligantes de Notch estão envolvidos nos sítios inflamatórios da infecção, pois ocorre aumento da expressão dos mesmos na superfície de células envolvidas nesse processo (YABE et al., 2005; NIRAJAN et al., 2008).

No sistema imune, a sinalização Notch regula múltiplas etapas de desenvolvimento de células T e B além de regularem as funções e diferenciação das células T. Os ligantes e receptores de Notch são induzidos em macrófagos por vários estímulos, inclusive ativação de TLR, e alguns trabalhos vêm demonstrando um papel na apresentação de antígenos por meio do ligante Delta 1 que promove células do tipo Th1 ou pelo ligante Jagged que promove células do tipo Th2. A sinalização Notch também está sendo implicada no desenvolvimento de células mielóides, como macrófagos, e TLR parece ativar indiretamente a via de Notch, promovendo ativação de NF-κB e TNF-α (FUNG et al., 2007; MONSALVE et al., 2006; PALAGA et al., 2008; HU et al., 2008).

Já foi demonstrado que macrófagos de linhagem estimulados com LPS+IFN-γ apresentam um aumento da expressão de receptor Notch-1 assim como do ligante Jagged-1 (MONSALVE et al., 2006). Nessa mesma linha, Fung e colaboradores (2007) demonstraram que macrófagos humanos estimulados com LPS apresentam aumento na expressão do ligante Delta 4, a qual é dependente da ativação de TLR 4 e NF-κB. Estes mesmos autores demonstraram que a ativação da via notch por Delta 4 levou à transcrição de genes pró-inflamatórios como IL-1β em macrófagos (FUNG et al., 2007).

Em 2009, Monsalve e colaboradores demonstraram que, a ativação da via de sinalização Notch aumenta a expressão de NF-κB, favorecendo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, como as citocinas TNF-α e IL-6 ou enzimas, como a iNOS. Os mesmos autores demonstraram que o ligante Delta 4 parece ser o mais eficaz para induzir ativação de NF-κB nesses macrófagos.

Monsalve e colaboradores (2006) mostraram que Notch interfere na atividade de fatores transcricionais implicados na ativação de macrófagos, como AP-1 e STAT 1/3, mas sem afetar fatores importantes como NF-κB. Dessa forma, a sinalização Notch pode estar envolvida na modulação da função de macrófagos em uma resposta imunológica. Por exemplo, os macrófagos em um foco infeccioso podem não encontrar o ligante apropriado para ativar Notch, uma situação que favorece a sua atividade citotóxica. Em contrapartida,

os macrófagos que migraram para os órgãos linfoides para ativar as células T poderão receber uma ativação adequada de Notch potencializando sua capacidade de apresentar o antígeno e limitando os seus efeitos citotóxicos. Os ligantes de Notch estão envolvidos nos sítios inflamatórios da infecção, pois ocorre aumento da expressão dos mesmos na superfície de células envolvidas nesse processo (YABE et al., 2005; NIRAJAN et al., 2008).

Palaga e colaboradores (2008) demonstraram o envolvimento da sinalização Notch na regulação da resposta inflamatória em macrófagos após estimulação com LPS. Em 2011, Wongchana e Palaga, evidenciaram que Notch regula diretamente IL-6 ao associar-se com o CSL, que se liga na região promotora do gene de IL-6. Sabe-se que a sinalização Notch depende do contexto do ambiente, e que o controle da produção de IL-6 pode ser regulado de maneira diferente de acordo com os tipos celulares.

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

Mecanismos de defesa contra fungos são numerosos, incluindo os mecanismos de proteção da imunidade inata e também adaptativa, na qual é induzida especificamente pelo patógeno (ROMANI, 2004).

Fungos ligam-se a anticorpos, complemento, surfactantes e receptores de reconhecimento padrão, caracterizando como uma porta de entrada. A opsonização por esses mecanismos promove a ativação do sistema imune inato, por meio de células fagocíticas e sinalização via receptores. Os componentes da parede fúngica são altamente conservados e permitem a ativação de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e também células epiteliais (BROWN, 2011).

Na maioria das micoses, monócitos/macrófagos são críticos em funções imunes efetivas, implicados em mecanismos inatos contra infecções fúngicas (LOUIE, et al., 1994; SMITH, et al., 1990). Essas células têm um papel importante na regulação de produção de citocinas, funcionando como mediadores de resposta inflamatória. Como observado em

outras micoses sistêmicas, a defesa mais relevante do hospedeiro contra a PCM é a imunidade celular mediada principalmente por IFN-γ durante a ativação de macrófagos (KASHINO et al., 2000).

Estudos recentes delinearam a sinalização Notch durante a ativação de macrófagos. Expressão constitutiva dos componentes da via de sinalização é detectada em macrófagos primários, macrófagos de linhagem tanto humano como murino (ZHANG et al., 2010; FUNG et al., 2007; FOLDI et al., 2010; MONSALVE et al., 2006; HU et al., 2008). O receptor Notch, ligantes e genes alvos da via têm sua expresão aumentada em macrófagos em resposta a estimulos pró-inflamatórios, incluindo ligantes de TLR (FUNG et al., 2007; ITO, et al., 2009; FOLDI et al., 2010; MONSALVE et al., 2009; PALAGA et al., 2008; HU et al., 2008; TSAO et al., 2011; OUTTZ, et al., 2010; GOH et al., 2009).

Foi verificado que uma superexpressão de NICD1 em células Raw 264.7 aumenta a ativação de STAT1 em resposta à LPS e IFN-γ, levando ao aumento da expressão de moléculas características de macrófagos ativados (MONSALVE et al., 2006; MONSALVE et al., 2009). Essa superexpressão de NICD1 também induziu aumento da expressão de citocinas TNF-α e IL-6 e da enzima iNOS (MONSALVE et al., 2009). Entretanto, a inibição do receptor Notch 1 com GSI, DAPT ou shRNA praticamente aboliu a atividade de NF-κB mesmo com estímulo de LPS (MONSALVE et al., 2009). Assim, um mecanismo pelo qual a sinalização Notch contribui na resposta inflamatória é o aumento da atividade de NF-κB.

A inibição da sinalização Notch em macrófagos de medula utilizando GSI, IL-CHO, é capaz de diminuir a indução de IL-6, iNOS e TNF-α mesmo com ativação via LPS e/ou IFN-γ (PALAGA et al., 2008). Tratamento com DAPT atenuou a produção de IL-1β e IL-6 em células Raw 264.7 mesmo com ativação via LPS, além de diminuir essas citocinas em modelo de sepsi *in vivo* (TSAO, et al., 2011).

Os mecanismos pelo qual Notch regula macrófagos são:

1) Ligação direta ao RBP-J, suportado pelas observações de que uma mutação no RBP-J no promotor de IL-6 diminui a atividade do gene de IL-6 (HU, et al., 2008);
2) Regulação indireta por meio da transcrição de fatores de ativação como IRF8 (XU et al., 2012);
3) Reprogramação do metabolismo da mitocôndria (XU et al., 2015).

Dessa forma, a sinalização Notch – RBP-J contribui para a produção de citocinas induzidas por TLR durante a ativação de macrófagos.

Outtz e colaboradores (2010) demonstraram que existe uma diminuição do recrutamento de macrófagos e da expressão de TNF-α em camundongos com Notch1

inibido. Experimentos com GSI ou superexpressão de NICD1 demonstram que a sinalização Notch mediada por LPS/IFN-γ induz a expressão de VEGFR-1, que é importante no recrutamento e função de macrófagos durante a inflamação. Em modelo experimental de lúpus eritematoso (SLE), o bloqueio de Notch usando DAPT atenuou a produção de citocinas inflamatórias (ZHANG et al., 2010).

Sabe-se que as leveduras do *P. brasiliensis* quando interagidas com macrófagos promove a ativação da via de Notch, por meio do receptor Notch 1, induzindo maior produção de IL-6, citocina importante para o crescimento do fungo no hospedeiro (SIQUEIRA et al., 2009), conjuntamente com a diminuição de TNF-α, o que prejudica a atividade fungicida dos macrófagos. Como esses dados se mostraram muito promissores e sabendo que existe uma correlação entre as vias de sinalização Notch e TLR, investigaremos a relação entre essas vias de sinalização, assim como o tipo de resposta imune adaptativa envolvida no processo. Certamente, o entendimento dessas questões será importante para o melhor conhecimento da resposta imune inata e adaptativa na PCM experimental.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi investigar a inter-relação entre as vias de sinalização Notch e TLR (TLR 4), bem como a importância e influência sobre a modulação de atividades exercidas por macrófagos durante a infecção por *P. brasiliensis* isolado Pb18.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a influência da inibição da via de Notch em macrófagos, por meio do inibidor farmacológico DAPT, na produção de citocinas pró-inflamatórias e na viabilidade do fungo;
- Determinar a influência da inibição da via de Notch, por meio do inibidor farmacológico DAPT, no tipo de resposta imune adaptativa induzida;
- Determinar a correlação entre as vias de Notch e TLR 4, assim como a importância na paracoccidioidomicose experimental em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute para TLR 4;
- Verificar a importância e influência que a via de sinalização Notch exerce em linfócitos T, por meio da inibição em camundongos BALB/c NUDE;
- Analisar a correlação entre as vias de Notch e TLR 4.

3. Material e Métodos

3.1 Ensaios *in vitro*

3.1.1 Fungo

Utilizou-se a cepa virulenta Pb 18 (KASHINO et al., 1987) do *P.brasiliensis* nos ensaios de interação com macrófagos *in vitro* e nos ensaios de infecção. A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (KASVI), em estufa a 37 ºC, com repiques quinzenais.

3.1.2 Cultura de macrófagos da linhagem J774

Os macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife) e gentamicina (40 μg/mL) (Gibco). A cultura foi mantida em estufa de 5% de CO_2 à 37 ºC, com repique a cada dois dias.

3.1.3 Preparo do inóculo do Pb18

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

3.1.4 Inibição da via de Notch

Para os ensaios nos quais a via de Notch foi inibida farmacologicamente, macrófagos J774 e BMDMs foram pré-incubados com DAPT (Tocris Biosciences), inibidor de γ-secretase, numa concentração de 10 μM por 24 horas. Decorrido o período de incubação com o inibidor, as células foram lavadas com PBS 1x, o inibidor foi adicionado novamente e então as células foram interagidas com leveduras do Pb18 (proporção de 1:1) por um período de 4, 12 e 24 horas.

3.1.5 Análise da expressão gênica

3.1.5.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total das amostras de macrófagos da linhagem J774 interagidos com Pb18 foi realizada com o Trizol Reagent (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em 1,0 mL de Trizol (1,0 mL de Trizol para $2x10^6$ células) e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (MERCK) por 1 mL de trizol e agitou-se com as mãos por 15 segundos. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 15000 g por 15 minutos à 4°C, sendo que o sobrenadante transferido para outro tubo. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico (SIGMA) e congelado à -80 °C por 20 minutos. As amostras foram, então centrifugadas por 30 minutos a 15000 g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 75% (1 mL EtOH (SYNTH) para 1 mL trizol). As amostras foram vortexadas e centrifugadas a 15000 g por 5 minutos à 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi seco por 10-15 minutos no fluxo laminar. Posteriormente as amostras foram ressuspendidas em água DEPC (Invitrogen – contém 0,1% diethylpyrocarbonate) e incubadas por 10 minutos à 55- 60 °C. A integridade do RNA foi verificada em gel de desnaturante.

3.1.5.2 Gel de Desnaturante

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

3.1.5.3 Quantificação do RNA total

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

3.1.5.4 Pureza do RNA total

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

TAMPÃO AMOSTRA DE RNA: Para 1 mL de tampão:

- 145 mL H2O DEPC
- 150 mL MOPS 10x
- 750 mL formamida
- 90 mL formaldeído
- 2 mL brometo de etídeo
- 1 pitada de azul de bromofenol
    - Homogeneizou-se tudo e armazenou em geladeira, ao abrigo da luz.

TAMPÃO MOPS: Para 1 L de tampão:

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

3.1.5.5 Tratamento de RNA com DNAse

A fim de remover possível DNA genômico das preparações de RNA, o material foi tratado com kit de DNase I (Fermentas). O RNA foi incubado com 10x reaction buffer com $MgCL_2$, DNAse I e água DEPC à 37 °C por 1 hora. Posteriormente, adicionou-se EDTA (1 µL para cada 10 µL do total da reação) e incubou-se à 65 °C por 10 minutos.

3.1.5.6 Síntese de cDNA

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

3.1.5.7 PCR *em Tempo Real*

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

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

PRIMER	FOWARD	REVERSE
notch 1	5’GCTGGACTGGCGTCAACT3’	5'CACAGAGCCCTCCATGCT 3'

Tabela 1. Sequência de Primers utilizados nos ensaios de qRT-PCR

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

3.1.6 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 BALB/c, TLR 4 KO e C57BL/6. 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) por 7 dias, a 37 °C e 5% de CO_2. Após esse 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.

3.1.7 Obtenção de macrófagos derivados de medula (BMDMs) de camundongos BALB/c, C57BL/6 e TLR $4^{-/-}$

Os BMDMs foram obtidos segundo descrito por Marim etal*.* (2010). Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO_2 e os fêmures dos animais removidos e lavados com PBS 1x para coleta da medula óssea com auxílio de uma seringa de insulina (1 mL). As células foram incubadas em 10 mL de meio R20/30 (meio RPMI-1640 acrescido de 0.1% gentamicina, 0.2% bicarbonato de sódio (SYNTH), 0.6% Hepes Buffer, 20% de Soro Fetal Bovino (Vitrocell-Embriolife) e 30% de LCCM - sobrenadante de cultura de células L929) por quatro dias em estufa a 37 ºC e 5% CO_2. A suplementação do meio foi feita no quarto dia com mais 10 mL de R20/30 e o sistema mantido por mais três dias. Após esses sete dias de diferenciação, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas lavadas com PBS 1x gelado e mantidas por 10 minutos em gelo. Os macrófagos foram coletados em seguida por pipetagem e ressuspensos em meio R10/5 (meio RPMI-1640 acrescido de 0.1% gentamicina, 0.2% bicarbonato de sódio, 0.6% Hepes Buffer,10% de Soro Fetal Bovino e 5% de LCCM) na concentração de trabalho indicada.

3.1.8 Unidades formadoras de colônias

O teste de UFC consiste no crescimento de leveduras de Pb18 em meio sólido após interação entre as células e o fungo. As células foram, então, lisadas com 800 μL de água destilada estéril por aproximadamente 5 minutos, até total lise das células observadas em microscópio e então, 100 μL do sobrenadante foi plaqueado. As placas foram mantidas em

estufa bacteriológica por 20 dias, até crescimento das colônias do fungo. O meio de cultura utilizado no plaqueamento foi o meio BHI (KASVI) suplementado com 5% de SFB, como fonte de fator de crescimento do fungo a ser isolado, conforme descrito por Soares et al., 2010.

3.1.9 Dosagem de citocinas (ELISA)

Os níveis de IL-6, IL-10 e TNF-α foram mensurados com o ensaio imunoenzimático de acordo com instruções do fabricante (Kit da R&D Systems). Em uma placa de 96 poços (Corning) adicionou-se o anticorpo anticitocina de interesse como anticorpo de captura, numa concentração recomendada pelo fabricante, diluído em solução salina tamponada com fosfato – PBS (50 μL/poço). A placa foi mantida durante uma noite à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e incubada por 1 hora à temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio constituída de 1% BSA em PBS 1x. Aos poços, adicionou-se, em duplicata, a citocina de interesse recombinante para obtenção de curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante, e então adicionou-se as amostras do sobrenadante de cultura de macrófagos interagidas com o fungo seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Então, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. O anticorpo de detecção foi, então, adicionado e a placa foi novamente incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido esse tempo, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e adicionou-se avidina conjugada à peroxidase, por 20 minutos, ao abrigo da luz. Novamente realizou-se a etapa de lavagem e adicionou-se a solução reveladora constituída de TMB (BD Biosciences). A reação foi bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas.

3.1.10 Análise de morte celular promovida pelo fungo (LDH – Mensuração da Lactato desidrogenase)

Após interação entre os macrófagos J774 e leveduras de Pb18 realizou-se a mensuração da lactato desidrogenase (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity – PROMEGA), de modo a verificar se o fungo tinha a capacidade de matar esses macrófagos. Para isso, o sobrenadante desse ensaio foi recolhido e 50 μL foram pipetados para uma placa de 96 wells (Corning). Em seguida, adicionou-se 50 μL do substrato em cada poço, e incubou-se por 30 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, adicionou-se 50 μL da solução stop. E a leitura foi realizada na absorbância de 490 nm.

3.1.11 Ensaio de Fagocitose

Após cultivo, cerca de $2x10^5$ de J774 e de BMDM/poço foram incubados por 40 minutos em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro, utilizando-se meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino. Decorrido esse tempo, adicionou-se o DAPT -10 mM/mL (Tocris Bioscences) e LPS -1 mg/mL (Sigma) e incubou-se em estufa de 5% CO_2 à 37 ºC por 24 horas e 16-18 horas respectivamente. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x, para posterior interação com $2x10^5$ leveduras de Pb18/poço para uma cinética de 4, 12 e 24 horas em estufa de 5% CO_2 à 37 ºC. O sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior análise de citocinas. As lamínulas foram coradas com o kit hematológico comercial Instant-Prov (Newprov); seguida de fixação em lâminas utilizando-se o Entellan (MERCK) e, posteriormente, análise em microscópio óptico. As lâminas foram analisadas por meio de microscopia ótica e o índice de fagocitose foi determinado pela equação de Campos etal. (2006), que definiu o índice como o produto entre a percentagem de macrófagos que fagocitaram pelo menos uma levedura e o número médio de leveduras nessas células.

3.2 Ensaios *in vivo*

3.2.1 Fungo

Utilizou-se a cepa virulenta Pb 18 (KASHINO et al., 1987) do *P.brasiliensis* nos ensaios de infecção. A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (KASVI), em estufa a 37 ºC, com repiques quinzenais.

3.2.2 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8 a 12 semanas de vida foram obtidos do Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Também obtivemos camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8 semanas de vida do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos em padrão SPF. Os camundongos foram eutanasiados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEUA).

3.2.3 Preparação do inóculo de Pb18

Foi realizado de acordo com o protocolo já descrito na página 54.

3.2.4 Inibição da via de Notch

Para os ensaios nos quais a via de Notch foi inibida farmacologicamente, DAPT (γ-secretase inhibitor IX – Calbiochem) foi administrado intraperitonealmente com 8 mg/kg (solução: 90% óleo de milho em etanol – 82,4 μL óleo de milho (Leve) + 8 μL DAPT + 9,6 μL etanol absoluto (SIGMA)) ou veículo (82,4 μL óleo de milho + 8 μL DMSO (SIGMA) + 9,6 μL etanol absoluto (SIGMA)) nos camundongos BALB/c e BALB/c NUDE por 15 dias (3 dias com DAPT/ 3 dias sem DAPT). Decorrido esse período, realizou-se a infecção intratraqueal com leveduras de Pb18.

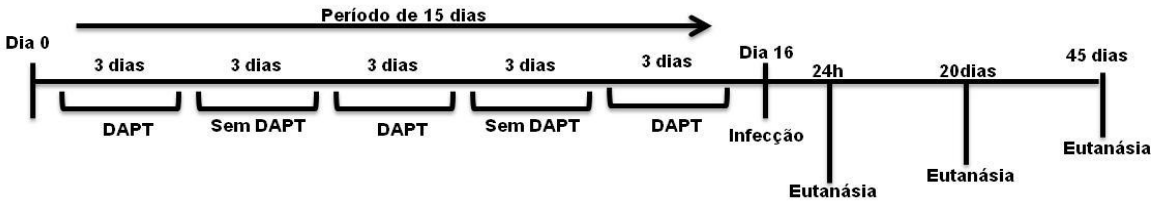

Figura 6. Tratamento com DAPT. Esquema do tratamento com inibidor farmacológico DAPT nos camundongos BALB/c e BALB/c NUDE por 15 dias, seguido de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18. Após 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção, grupo de 5 animais foram sacrificados e realizou-se os ensaios de ELISA, dosagem de imunoglobulinas, UFC e marcação das células do pulmão e linfonodo por citometria de fluxo.

Para este ensaio, dividimos os camundongos em três grupos, com 5 animais cada:

- grupo controle - PBS (tratamento com veículo e infecção com PBS)

- grupo DMSO (tratamento com veículo e infecção com Pb18)

- grupo DAPT (tratamento com inibidor e infecção com Pb18)

3.2.5 Infecção Intratraqueal

O procedimento foi realizado com animais sob efeito de anestésico: xilazina (pré-anestésico) (ANASEDAN, Cerva), ketamina (anestésico) (DOPALEN, Cerva) 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 foi exposta. Os animais foram, então, infectados com uma suspensão contendo $1x10^6$ de leveduras/mL contidas em 50 μL de PBS. Após a 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.

3.2.6 Antígeno Livre da Parede do Fungo (CFA)

O fungo *P. brasiliensis* isolado Pb18 na sua fase de levedura foi colocado em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) e agitado em vórtex por aproximadamente 10 minutos. Posteriormente o material foi centrifugado por 5 minutos a 2000 RPM, do qual foi recolhido o sobrenadante para obtenção do CFA.

3.2.7 Dosagem de Imunoglobulinas totais e isotipos

A dosagem de IgG total foi realizada por ELISA, com CFA na concentração de 4 μg/mL diluído em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,795 g em 500 mL de água destilada). Os isotipos foram dosados na presença de 4 μg/mL de CFA diluído no mesmo tampão. As placas foram incubadas por 16-18 horas em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, realizou-se 3 lavagens com PBS-Tween 20, seguido da adição de 200 μL da solução de bloqueio (PBS + 5% de leite molico + 2,5% de BSA) e incubou-se à 37 ºC por duas horas. Posteriormente, desprezamos a solução de bloqueio e sem lavar as placas, adicionamos os soros dos animais (diluído na proporção de 1:50 em PBS-leite). Incubou-se a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida lavamos as placas 3 vezes com PBS-Tween 20 e adicionamos 50 μL do anticorpo conjugado previamente titulado (anti-mouse IgG-peroxidase). Incubou-se a temperatura ambiente por 1 hora. As placas novamente foram lavadas e adicionamos 100 μL/ poço da solução revelação (1 mg/mL de OPD em tampão citrato fosfato). Incubou-se por 15 minutos no escuro. A reação foi parada com 50 μL H_2SO_4 4 N. A leitura foi realizada no leitor de ELISA com o filtro de 492 nm.

3.2.9 Imunofenotipagem de células dos pulmões e dos linfonodos regionais após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção intratraqueal com leveduras do Pb18 por citometria de fluxo

Os pulmões e linfonodos regionais (axilares e paratímicos) dos camundongos BALB/c e BALB/c NUDE foram macerados com 1mL de PBS 1x. As partículas maiores foram removidas com auxílio do cell strainer 70μm (BD Falcon). As células totais foram ajustadas na concentração de $5x10^5$ de células/poço e marcadas com os anticorpos: anti-CD11c APC (N418 – Biolegend), anti-MHC-II (I-A) PE (NIMR-4 - eBioscience), anti-CD11b PE (M1/70 – BD Bioscience), anti-NK1.1 PE (PK136 – BD Bioscencie), anti-Ly6C and Ly6G (RB6-8C5),

anti-F4/80 APC (BM8 – eBioscience), anti-CD19 PE (eBio1D3 – eBioscience), anti-CD3 PercP (145-2C11 – Biolegend), anti-CD4 PE (H129,19 BD Bioscencie), anti-CD8 APC (53-6.7 Biolegend).

Como controle utilizaram-se camundongos infectados com PBS. A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o aparelho FACS CANTO (Brcton & Dickison), as subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC e SSC, que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. Após a aquisição de dados necessários, estes foram analisados utilizados o programa FlowJo.

3.2.8 Ensaio de Linfoproliferação

Para o ensaio de linfoproliferação dois grupos, de 5 camundongos BALB/c cada, foram tratados por 15 dias com DAPT intraperitonealmente e depois infectados intratraquealmente, com $1,5x10^6$ leveduras da cepa Pb18. Após 20 dias de infecção foram eutanasiados na câmara de CO_2, e o baço retirado. Os órgãos foram colocados em um filtro de células de 70 µm (BD Falcon), encaixado em um tubo Falcon (BD Falcon) de 50 mL. Posteriormente, foram macerados e adicionamos PBS 1x para lavar o filtro, a fim de obter o maior número de células. O *pool* de células esplênicas foi centrifugado a 500 g por 5 minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 5 mL de tampão hemolítico, para lise das hemácias, por 4 minutos. Posteriormente, acrescentou-se 15 mL de PBS 1x e uma nova centrifugação foi realizada para retirar os excessos de fragmentos celulares. O pellet foi ressuspendido com 3 mL de meio R10 suplementado (1% de Aminoácidos Não Essenciais - MEM NEAA (Gibco) + 1% Piruvato de Sódio (Gibco)), para a contagem na câmara de Neubauer foi usado azul de Trypan. Após a contagem das células, utilizamos o marcador fluorescente CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl Ester, Invitrogen), de acordo com o protocolo do KIT.

As células foram ajustadas na concentração de $1x10^7$/mL, em seguida, centrifugadas a 500 g por 5 minutos. O pellet foi ressuspenso com 1 mL de PBS estéril aquecido a 37 °C, contendo 2 µM de CFSE. Incubamos a suspensão por 10 minutos a 37 °C, ao abrigo da luz, no entanto, de 2 em 2 minutos realizamos vigorosa agitação com pipeta de 1000 µL, a qual facilita a entrada do CFSE nas células de forma mais homogênea. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com meio RPMI e o pellet final foi ressuspenso com o meio R10 suplementado. Uma alíquota da suspensão foi analisada para verificarmos a eficiência da marcação por citometria de fluxo.

Posteriormente, realizamos uma nova contagem e as células foram ajustadas na concentração de $3x10^5$ em volume de 200 µL. Em placa de 96 poços de fundo U (Costar,

3799), adicionamos as células, juntamente os estímulos. Utilizamos como controle positivo Phitohemaglutinina (10μL/200μL) e como estímulo do fungo, o CFA (4 μg/mL). Por fim, incubamos a placa por 5 dias em estufa a 37 °C, em atmosfera contendo 5% CO_2.

No 5° dia, o conteúdo da incubação foi transferido para uma placa de fundo em "V", seguido de centrifugação, 500 g por 5 minutos. O pellet foi ressuspenso em tampão FACs para o início da marcação com anticorpos de citometria. A marcação foi realizada com anticorpos na diluição de 1:50 em PBS 1X acrescido de 1% de SFB. Os anticorpos monoclonais (BD) utilizados foram: anti-CD3 PercP (145-2C11 – Biolegend), anti-CD4 PE (H129.19 – BD Bioscience) e anti-CD8 APC (53-6.7 – Biolegend). As células com os anticorpos foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz, a 4 °C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FACs e adquiridas por citômetro de fluxo. A proliferação foi determinada pela diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE.

3.2.9 Dosagem de Citocinas

Os níveis de IL-6, IL-10, TNF-α, IL-17, IL-1β e IFN-γ foram mensurados com o ensaio imunoenzimático de acordo com instruções do fabricante (Kit da R&D Systems). Em uma placa de 96 poços (Corning) adicionou-se o anticorpo anticitocina de interesse como anticorpo de captura, numa concentração recomendada pelo fabricante, diluído em solução salina tamponada com fosfato – PBS (50 μL/poço). A placa foi mantida durante uma noite à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), e incubada por 1 hora a temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio constituída de 1% BSA em PBS 1x. Aos poços, adicionou-se, em duplicata, a citocina de interesse recombinante para obtenção de curva padrão, de acordo com as instruções do fabricante. Adicionou-se as amostras do sobrenadante de cultura de macrófagos interagidos com o fungo seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Então, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e o anticorpo de detecção foi, então, adicionado; a placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido esse tempo, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e adicionou-se avidina conjugada à peroxidase por 20 minutos, ao abrigo da luz. Novamente realizou-se a etapa de lavagem e adicionou-se a solução reveladora constituída de TMB. A reação foi bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas.

3.3 Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados obtidos foi realizada pelo programa Prism GraphPad, sendo que as análises estatísticas foram usadas de acordo com a distribuição dos dados obtidos.

4. Resultados

4.1 Ensaios com macrófagos J774

4.1.1 Análise da expressão gênica do receptor Notch 1 em macrófagos após interação de 24 horas com leveduras do Pb18, na ausência e presença de DAPT

A fim de estudarmos a capacidade do Pb18 em modular a ativação do receptor Notch 1 em macrófagos da linhagem J774 e verificarmos se o inibidor farmacológico DAPT é capaz de bloquear a níveis transcricionais da expressão gênica do mesmo receptor, realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Conforme a figura 7, podemos verificar que o fungo Pb18 consegue induzir o aumento a níveis transcricionais do receptor Notch 1 em macrófagos J774 após 24 horas de interação; e ao utilizarmos o DAPT, é possível observar diminuição dos níveis transcricionais desse receptor.

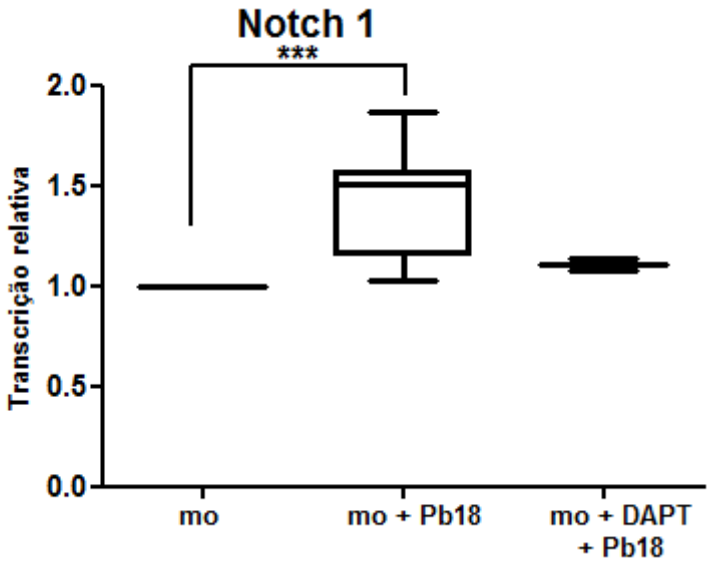

Figura 7. Análise transcricional do receptor Notch 1 em macrófagos J774 após interação de 24 horas com leveduras do Pb18. Macrófagos J774 foram interagidos na proporção de 1:1 com leveduras do Pb18 por 24 horas. Decorrido o tempo de interação, foi extraído o RNA total das células, sintetizado o cDNA e realizamos o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de transcritos foram analisados por qRT-PCR usando como controle endógeno o GAPDH. O ensaio foi realizado no aparelho 7500 Fast Real Time PCR Systems e a análise seguiu o método de quantificação relativa (ΔΔCT – ciclo linear). Resultado apresentado como média de três experimentos independentes, analisado pelo teste de Kruskal-Wallis, comparação múltipla de Dunn's ($P<0,05$). Resultado expresso em média dos níveis dos transcritos, com desvio padrão da média.

4.1.2 Análise das unidades formadoras de colônias do Pb18 após 24 horas de interação com macrófagos J774, na presença ou ausência de LPS/DAPT

Macrófagos são células fagocíticas profissionais, com alta capacidade fungicida. Sabendo disso, será que essa capacidade fagocítica tem alguma relação com a via de sinalização Notch? Será que ao inibirmos essa via, a viabilidade do fungo aumenta? De modo a responder esses questionamentos, o ensaio de UFC foi realizado para verificarmos a viabilidade do fungo na presença e ausência da via de Notch, assim como se existe relação com a via de TLR 4 (ativação por LPS).

Como podemos constatar na figura 8, após interação de 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras do Pb18 na presença tanto de LPS (ativador da via de TLR 4) e DAPT (inibidor da via de Notch) há diminuição da carga fúngica, quando comparamos com o grupo que foi ativado com LPS. Isso nos permite dizer que na ausência de Notch e concomitante ativação de TLR 4, os macrófagos J774 são mais fungicidas, capazes de diminuir a carga fúngica. Entretanto, não há diferença significativa entre o grupo apenas com Pb18 e com Pb18+DAPT.

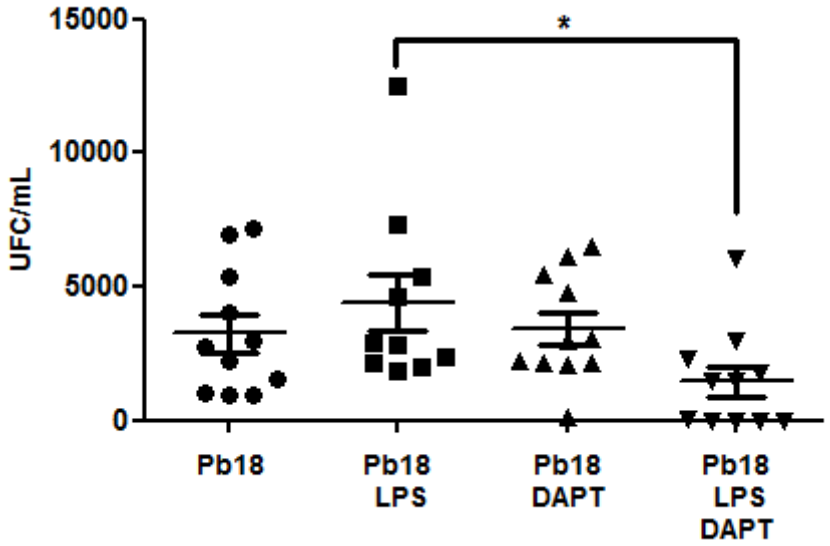

Figura 8. Unidades formadoras de colônias após 24 horas de interação entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18 na presença ou ausência de LPS/DAPT. Macrófagos J774 foram interagidos com leveduras de Pb18 na proporção de 1:1 por 24 horas. Decorrido o tempo de interação, as células foram lisadas com água e o fungo internalizado pelo macrófago foi plaqueado em meio BHI suplementado com 5% SFB, e incubado em estufa 37 ºC/5% CO_2 por 20 dias. Após o tempo de crescimento, as colônias dos fungos vivos foram contadas. Resultado apresentado como média de 6 experimentos independentes, analisado pelo teste de Kruskal-Wallis, comparação múltipla de Dunn's ($P<0,05$). Resultado expresso em média de UFC/mL, com desvio padrão da mediana.

4.1.3 Dosagem da produção de citocinas (IL-6 e TNF-α) após interação de 4h, 12h e 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras do Pb18, na presença ou ausência de LPS/DAPT

A produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos é extremamente importante na resposta imune contra fungos. A resposta imune dependerá de quais citocinas são produzidas e liberadas, sendo que as citocinas pró-inflamatórias são as mais eficazes logo no início da infecção. Dessa forma, verificamos a dosagem da produção de IL-6 e TNF-α após interação entre os macrófagos e Pb18.

4.1.3.1 Dosagem de IL-6

A IL-6 é uma citocina que tem um papel importante na regulação do sistema imune, hematopoiese, inflamação e oncogênese, e que sua produção pode ser relacionada com o reconhecimento de patógenos por receptores de reconhecimento padrão (PRR), além de ser importante na PCM. Verificamos, então, se a via de sinalização Notch tem alguma influência na produção desta citocina, após interação na proporção de 1:1 entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18.

Analisando a figura 9, é possível verificar que a produção de IL-6 é dependente da ativação de Notch, visto que com o DAPT há quase total diminuição de IL-6. Isso está de acordo com o observado por Wongchana & Palaga (2011), trabalho no qual eles demonstraram que a produção de IL-6 é diretamente regulada pela ativação do receptor Notch em macrófagos.

Verificamos também, que na presença de LPS, há aumento da produção de IL-6, mas quando há LPS e DAPT concomitantemente, existe diminuição da produção de IL-6, principalmente nos tempos de 12 e 24 horas de interação.

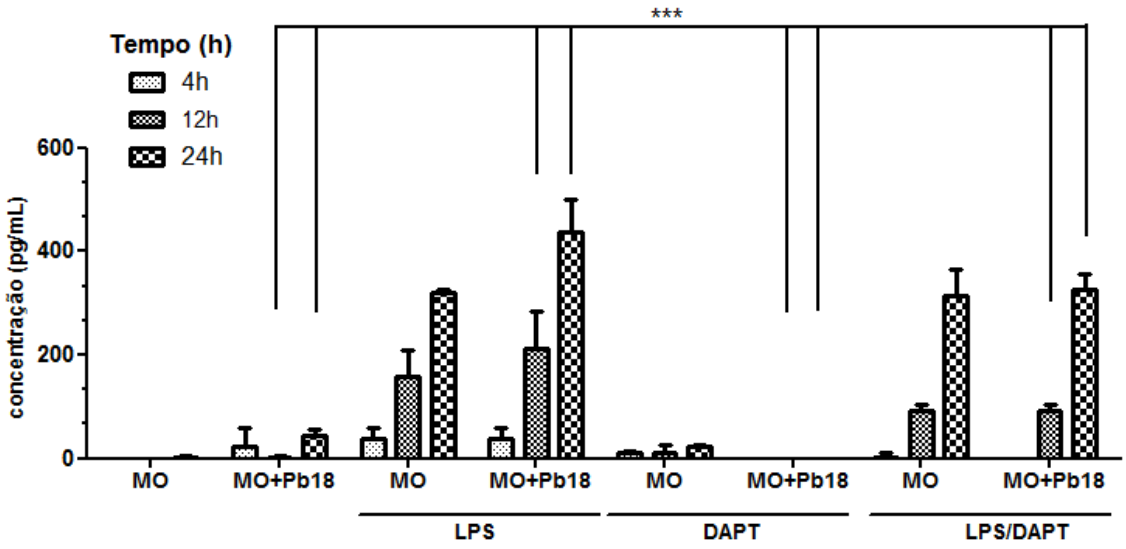

Figura 9. Perfil da secreção de IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18. Decorrido os tempos de interação, o sobrenadante foi recolhido e mensuramos a produção de IL-6. Realizamos a técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo do fabricante, para mensuração dos níveis da citocinas IL-6 no sobrenadante do ensaio de cinética entre macrófagos J774 e leveduras do Pb18. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,0001). Resultado expresso em média de concentração (pg/mL) com desvio padrão da média.

4.1.3.2 Dosagem de TNF-α

A citocina TNF-α é produzida por diferentes tipos celulares, sendo um agente pró-inflamatório potente, rapidamente liberada no início da infecção, e regula diversas funções dos macrófagos. Assim, realizar análise desta citocina é indispensável quando queremos verificar a resposta imune de macrófagos. Será que a inibição da sinalização Notch interfere na produção dessa citocina?

Como podemos verificar na figura 10, há interferência da produção de TNF-α quando inibimos a via de sinalização Notch. Nos tempos de 12 e 24 horas, principalmente, na presença de DAPT é possível constatar aumento de TNF-α, e esse aumento fica mais acentuado quando há ativação da via de TLR 4 por LPS. Ou seja, inibir a via de Notch, ao mesmo tempo em que ativa a via de TLR 4 induz aumento da produção de TNF-α em macrófagos, após 12 e 24 horas de interação com leveduras do Pb18.

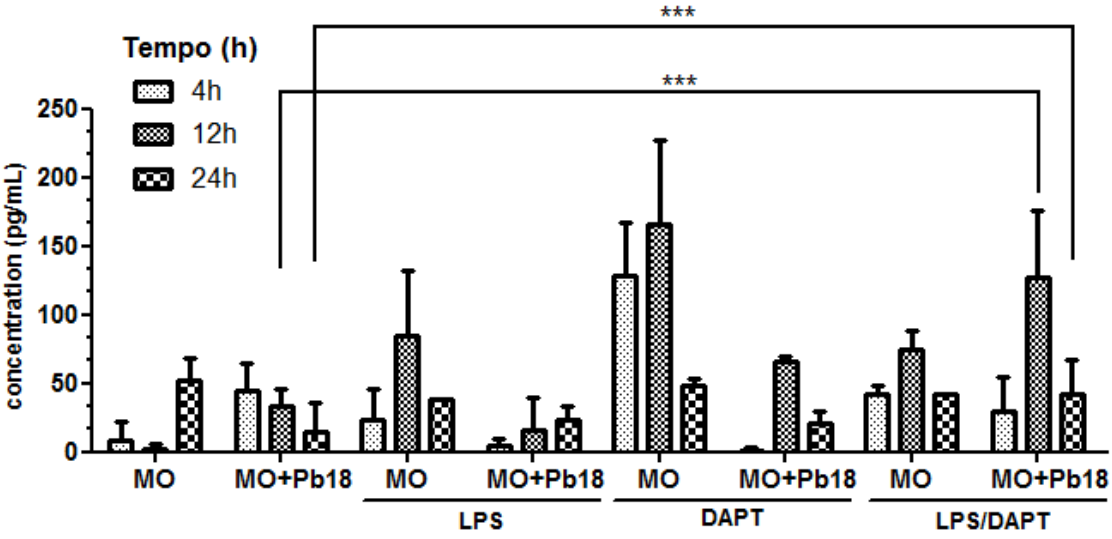

Figura 10. Perfil da secreção de TNF-α após interação de 4, 12 e 24 horas entre macrófagos J774 e leveduras de Pb18. Decorrido os tempos de interação, o sobrenadante foi recolhido e mensuramos a produção de TNF-α. Realizamos a técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo do fabricante, para mensuração dos níveis da citocinas TNF-α no sobrenadante do ensaio de cinética entre macrófagos J774 e leveduras do Pb18. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-way ANOVA, Bonferroni posttest (P<0,0001). Resultado expresso em média de concentração (pg/mL) com desvio padrão da média.

4.1.4 Análise de morte celular promovida pelo fungo

Uma pergunta que surgiu ao longo dos experimentos foi: "O fungo tem a capacidade de matar o macrófago? Será que todas essas diferenças que estamos verificando são devido a morte de macrófagos?" Para responder esses questionamentos, realizamos o ensaio de mensuração da lactato desidrogenase ou ensaio de citotoxicidade. A LDH é um marcador enzimático, cuja concentração é inversamente correlacionada com a viabilidade celular.

Ao obervarmos a figura 11, constatamos que a porcentagem de morte celular fica no máximo em torno de 25% (4 horas), e nos demais tempos de interação, quase não há morte celular. Isso nos permite dizer que o fungo não é citotóxico para os macrófagos J774.

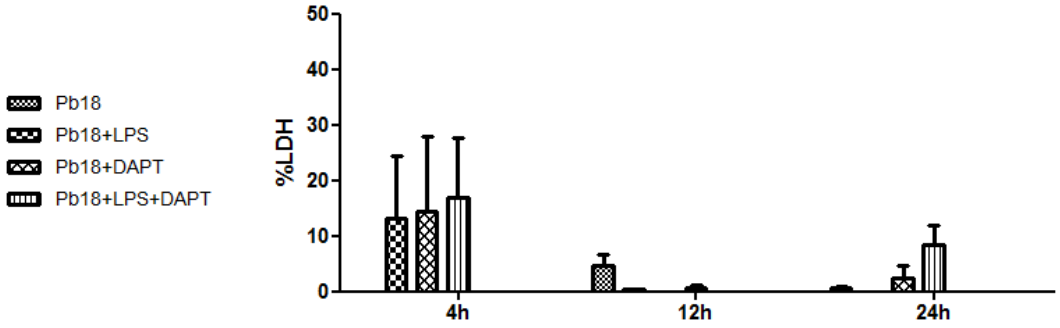

Figura 11. Determinação da citotoxicidade do Pb18 em macrófagos J774 após interação de 4, 12 e 24 horas com leveduras de Pb18, na presença ou ausência de LPS/DAPT. Mensuração da lactato desidrogenase no ensaio de cinética de interação entre macrófagos J774 e Pb18. Sobrenadante da interação foi recolhido e utilizado para dosagem de LDH. Resultado apresentado como média de dois experimentos independentes, analisado pelo teste de Kruskal-Wallis, comparação múltipla de Dunn's ($P<0,05$). Resultado expresso em média da porcentagem de LDH com desvio padrão da média.

4.2 Ensaios com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c

4.2.1 Análise das unidades formadoras de colônias após cinética de interação entre macrófagos derivados de medula óssea e leveduras de Pb18

Como a linhagem J774 de macrófagos é derivada de monócitos de camundongos BALB/c, decidimos usar também macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c a fim de verificarmos se o perfil analisado dos ensaios se manteria ou seria diferente dos macrófagos de linhagem. Começamos então, com o ensaio de UFC e realizamos uma cinética de interação, por 4, 12 e 24 horas de interação.

Como é possível verificar na figura 12, BMDMs tratados com DAPT apresentaram menor carga fúngica, e na presença de LPS/DAPT houve também diminuição da carga fúngica. Resultados similares ao visto com macrófagos J774.

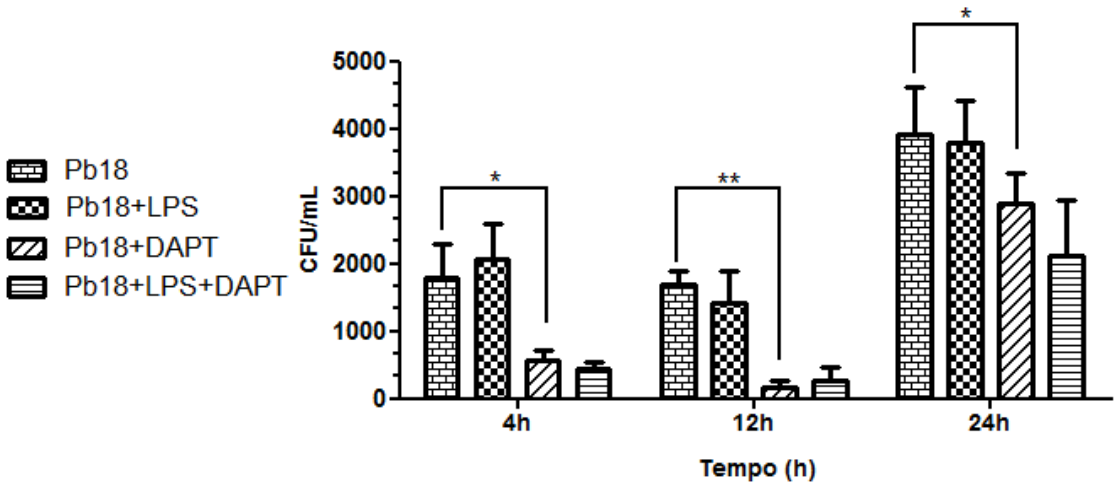

Figura 12. Unidades formadoras de colônias após cinética de interação (4, 12 e 24 horas) entre BMDMs e leveduras de Pb18 na presença ou ausência de LPS/DAPT. Macrófagos BMDMs foram interagidos com leveduras de Pb18 na proporção de 1:1 por 4, 12 e 24 horas. Decorrido o tempo de interação, as células foram lisadas com água e o fungo internalizado pelo macrófago foi plaqueado em meio BHI suplementado com 5% SFB, e incubado em estufa 37 ºC/5% CO_2 por 20 dias. Após o tempo de crescimento, as colônias dos fungos vivos foram contadas. Resultado representativo de 3 experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-away ANOVA, Bonferroni post-test (P<0,0001). Resultado expresso em média de UFC/mL, com desvio padrão da mediana.

4.2.2 Ensaio de Fagocitose

Durante minha dissertação de mestrado, resultados com macrófagos J774 evidenciaram diferença de fagocitose, quando havia bloqueio da via de sinalização Notch. Será que esse perfil é o mesmo em BMDMs de BALB/c? Realizamos, então, o ensaio de fagocitose, também com cinética de interação.

Obervamos, então, que esses macrófagos na presença de DAPT apresentam diminuição do índice de fagocitose, e na presença de LPS/DAPT também há diminuição do índice de fagocitose (Figura 13). Dessa forma, essas células com o bloqueio da sinalização Notch apresentam menor capacidade fagocítica, mas maior atividade fungicida (menor carga fúngica). Resultado diferente do que observamos em macrófagos J774, no qual apresentam maior atividade fagocítica com menor carga fúngica. Na figura 13, temos a ilustração das leveduras internalizadas nos macrófagos.

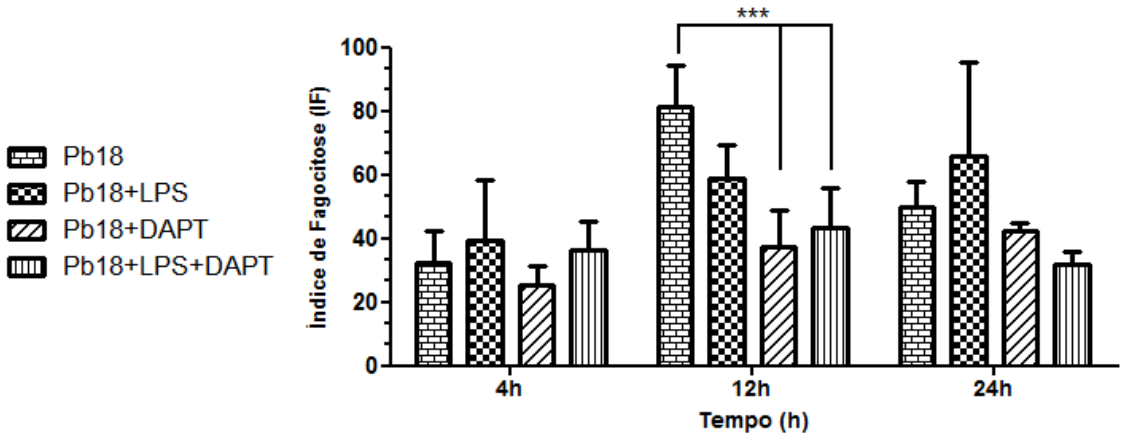

Figura 13. Índice de fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs após cinética de interação (4, 12 e 24 horas) na presença ou ausência de LPS/DAPT, observada por microscopia. Análise das lamínulas por microscopia de 100 células viáveis por amostra. Índice de fagocitose calculado por meio de multiplicação da proporção de células viáveis que fagocitaram pelo número médio de leveduras fagocitadas por estas células. Resultado representativo de 3 experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-Way ANOVA, Bonferroni post-test (P<0,005). Resultado expresso em índice de fagocitose, com desvio padrão da mediana.

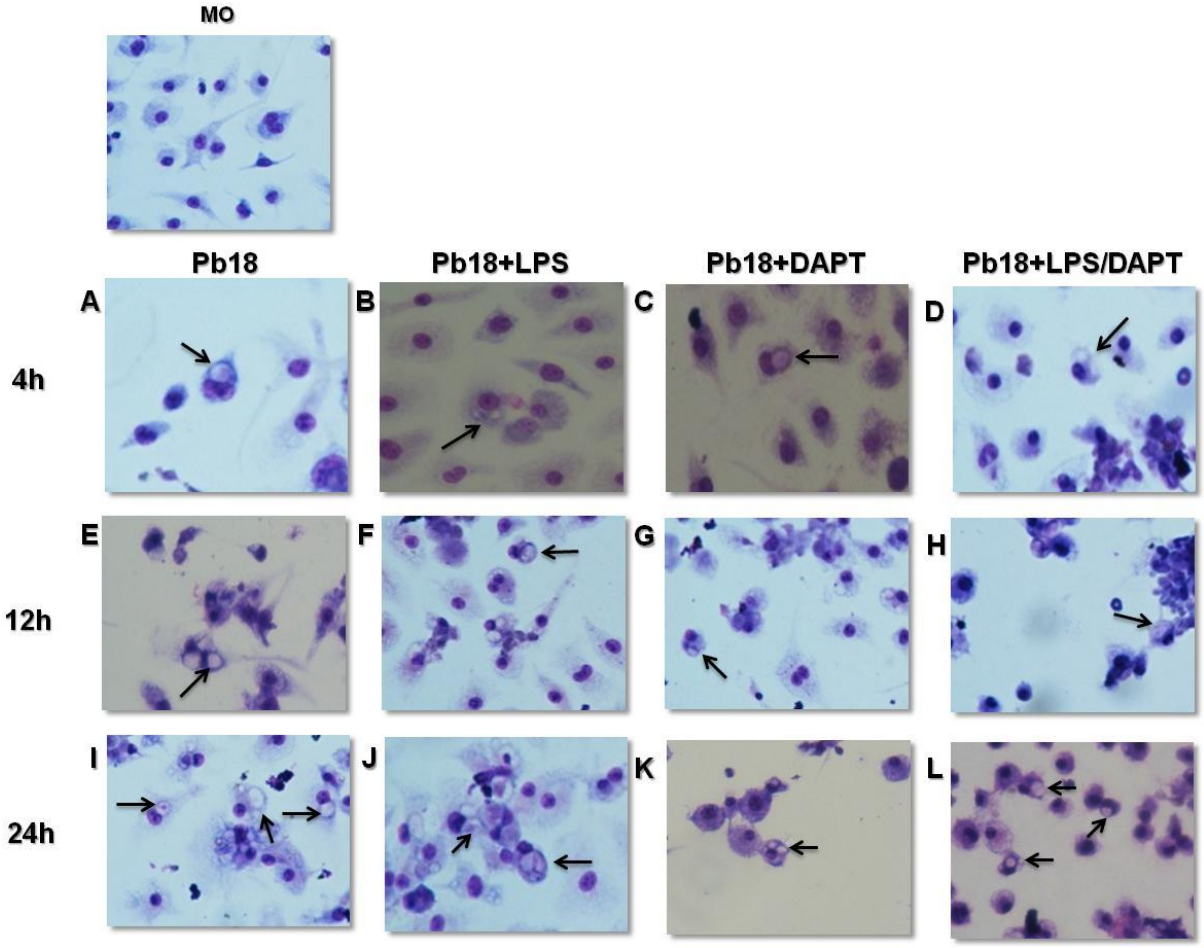

Figura 14. Fagocitose de leveduras de Pb18 por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c na presença ou ausência de LPS/DAPT, observada por microscopia. (A, E, I) Perfil das células após 4, 12 e 24 horas e interação com as leveduras na proporção (1:1). (B, F, J) Perfil das células na presença de LPS após 4, 12 e 24 horas e interação com as leveduras na proporção (1:1). (C, G, K) Perfil das células na presença de DAPT após 4, 12 e 24 horas e interação com as leveduras na proporção (1:1). (D, H, L) Perfil das células na presença de LPS/DAPT após 4, 12 e 24 horas e interação com as leveduras na proporção (1:1). As setas apontam as leveduras internalizadas. Coloração de Giemsa. Aumento de 400x. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.2.3 Dosagem da produção de citocinas (IL-6 e TNF-α) após interação de 4, 12 e 24 horas de interação entre macrófagos derivados de medula óssea e leveduras do Pb18, na presença ou ausência de LPS/DAPT

Em macrófagos J774 observamos que na presença de LPS/DAPT, há diminuição de IL-6 e aumento de TNF-α. Mas será que esse perfil também será observado em macrófagos derivados de medula óssea? Realizamos, assim, a dosagem de IL-6 e TNF-α após a cinética de interação.

4.2.3.1 Dosagem de IL-6

Conforme podemos observar na figura 15, os macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c na presença de DAPT apresentam menores concentrações de IL-6 no sobrenadante e o mesmo ocorre na presença de LPS/DAPT, principalmente após 12h de interação.

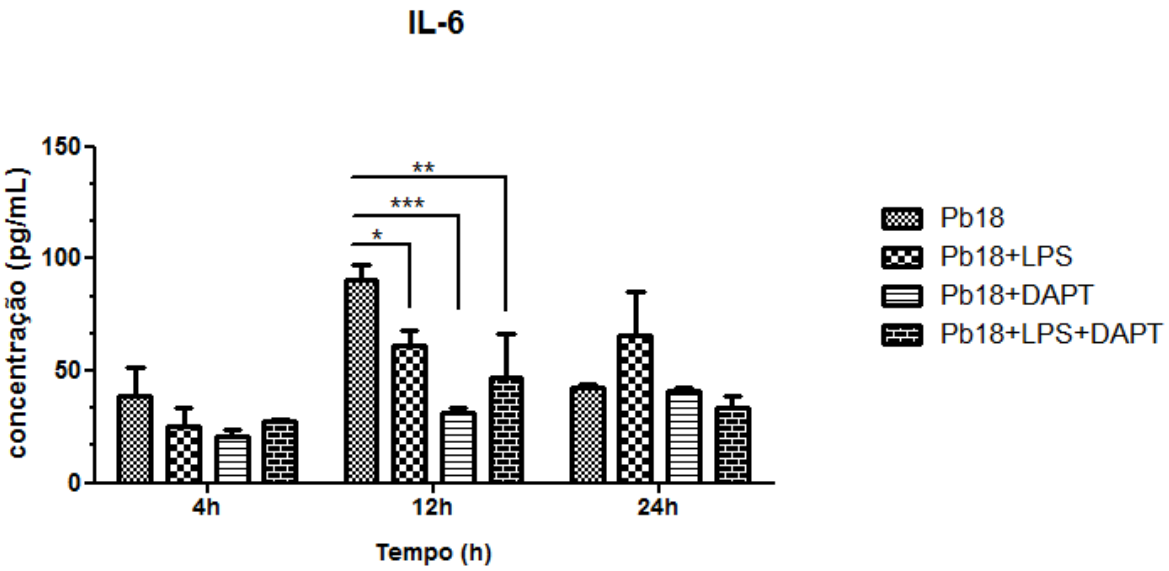

Figura 15. Perfil da secreção de IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas entre BMDMs e leveduras de Pb18. Decorrido os tempos de interação, o sobrenadante foi recolhido e mensuramos a produção de IL-6. Realizamos a técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo do fabricante, para mensuração dos níveis da citocinas IL-6 no sobrenadante do ensaio de cinética entre BMDMs e leveduras do Pb18. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-way ANOVA, Bonferroni posttest (***P<0,0001; **P<0,001; *P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (pg/mL) com desvio padrão da média.

4.2.3.2 Dosagem de TNF-α

Já na figura 16, conseguimos analisar que o perfil de secreção de TNF-α é o oposto ao da IL-6. Na presença de DAPT existe aumento da secreção desta citocina e este aumento também é visto na presença de LPS/DAPT. Resultados similares ao que vimos com macrófagos J774.

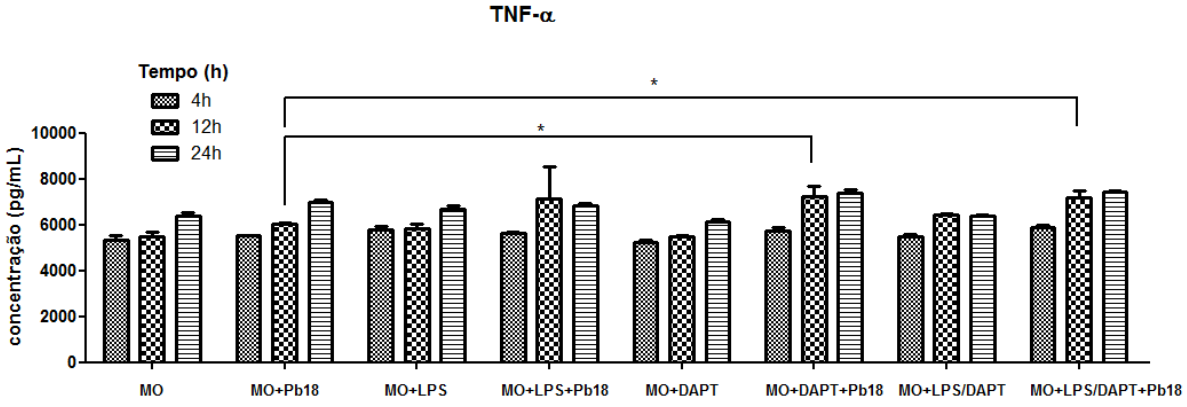

Figura 16. Perfil da secreção de TNF-α após interação de 4, 12 e 24 horas entre BMDMs e leveduras de Pb18. Decorrido os tempos de interação, o sobrenadante foi recolhido e mensuramos a produção de TNF-α. Realizamos a técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo do fabricante, para mensuração dos níveis da citocinas TNF-α no sobrenadante do ensaio de cinética entre BMDMs e leveduras do Pb18. Resultado representativo de três experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-way ANOVA, Bonferroni posttest (*P<0,05). Resultado expresso em média de concentração (pg/mL) com desvio padrão da média.

4.3 Ensaios com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e TLR 4$^{-/-}$

4.3.1 Análise das unidades formadoras de colônias após interação entre macrófagos derivados de medula óssea com leveduras do Pb18

De maneira a entender a importância da sinalização via receptor TLR 4 e sua relação com a via de sinalização Notch utilizamos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos TLR 4$^{-/-,}$ e como controle macrófagos derivados de camundongos C57BL/6.

Na figura 17, constatamos que a ausência de TLR 4 já diminui a carga fúngica ao comparar com o controle (WT), sendo independente da sinalização Notch, já que na presença de DAPT a carga fúngica fica semelhante ao controle com DAPT.

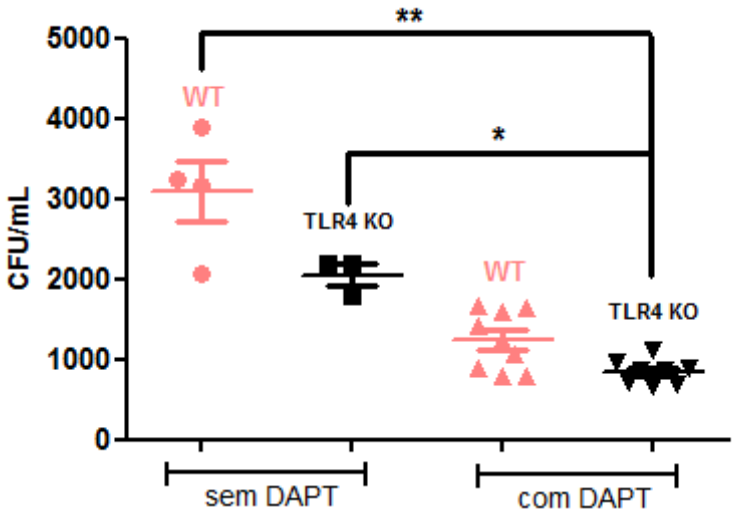

Figura 17. Comparação entre as unidades formadoras de colônias após 24 horas de interação entre BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR 4$^{-/-}$ e leveduras de Pb18 na presença ou ausência de LPS/DAPT. Macrófagos foram interagidos com leveduras de Pb18 na proporção de 1:1 por 24 horas. Decorrido o tempo de interação, as células foram lisadas com água e o fungo internalizado pelo macrófago foi plaqueado em meio BHI suplementado com 5% SFB, e incubado em estufa 37 ºC/5% CO_2 por 20 dias. Após o tempo de crescimento, as colônias dos fungos vivos foram contadas. Resultado apresentado como média de 2 experimentos independentes, analisado pelo One Way ANOVA, Kruskal Wallis test (P<0,05). Resultado expresso em média de UFC/mL, com desvio padrão da mediana.

4.3.2 Ensaio de Fagocitose

Como observamos diferença na carga fúngica após interação entre macrófagos de medula tanto de C57BL/6 como de TLR $4^{-/-}$, fomos então investigar se há alteração na capacidade fagocítica destas células, na presença de DAPT.

Na figura 18, é evidente que os macrófagos derivados de camundongos TLR $4^{-/-}$ apresentam maior capacidade fagocítica que os controle (C57BL/6) e isso ocorre mesmo na presença de DAPT. O bloqueio da sinalização Notch em macrófagos controle evidencia uma queda na capacidade fagocítica, e o mesmo é observada nos macrófagos de TLR $4^{-/-}$, entretanto, a ausência do receptor TLR 4 não parece interferir tanto na capacidade fagocítica das células. Na figura 19, a ilustração com as leveduras internalizadas nos macrófagos de camundongos C57Bl6 (leveduras indicadas pelas setas pretas). E na figura 20, em macrófagos de camundongos TLR4 $^{-/-}$.

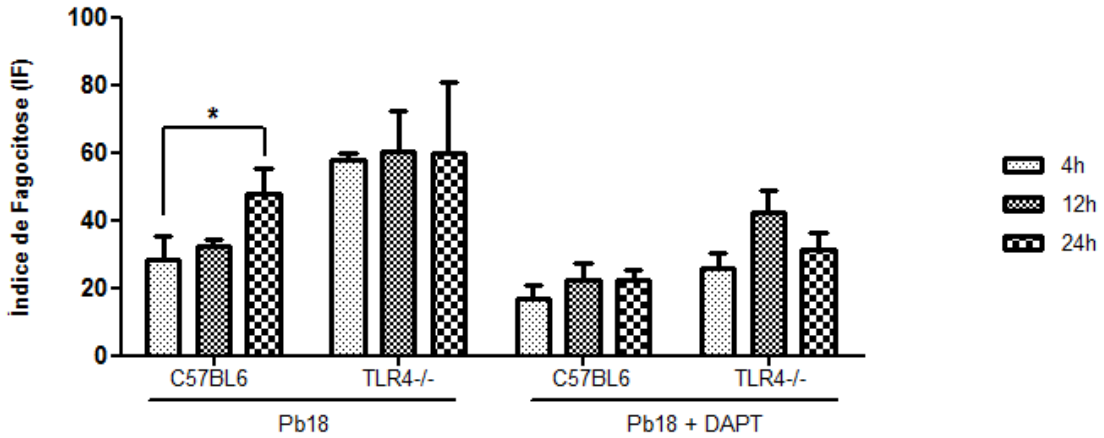

Figura 18. Índice de fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs de camundongos C57BL/6 e TLR $4^{-/-}$ após inibição da sinalização Notch, observada por microscopia. Análise das lamínulas por microscopia de 100 células viáveis por amostra. Índice de fagocitose calculado por meio de multiplicação da proporção de células viáveis que fagocitaram pelo número médio de leveduras fagocitadas por estas células. Resultado representativo de 3 experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-Way ANOVA, Bonferroni post-test ($P<0,005$). Resultado expresso em índice de fagocitose, com desvio padrão da mediana.

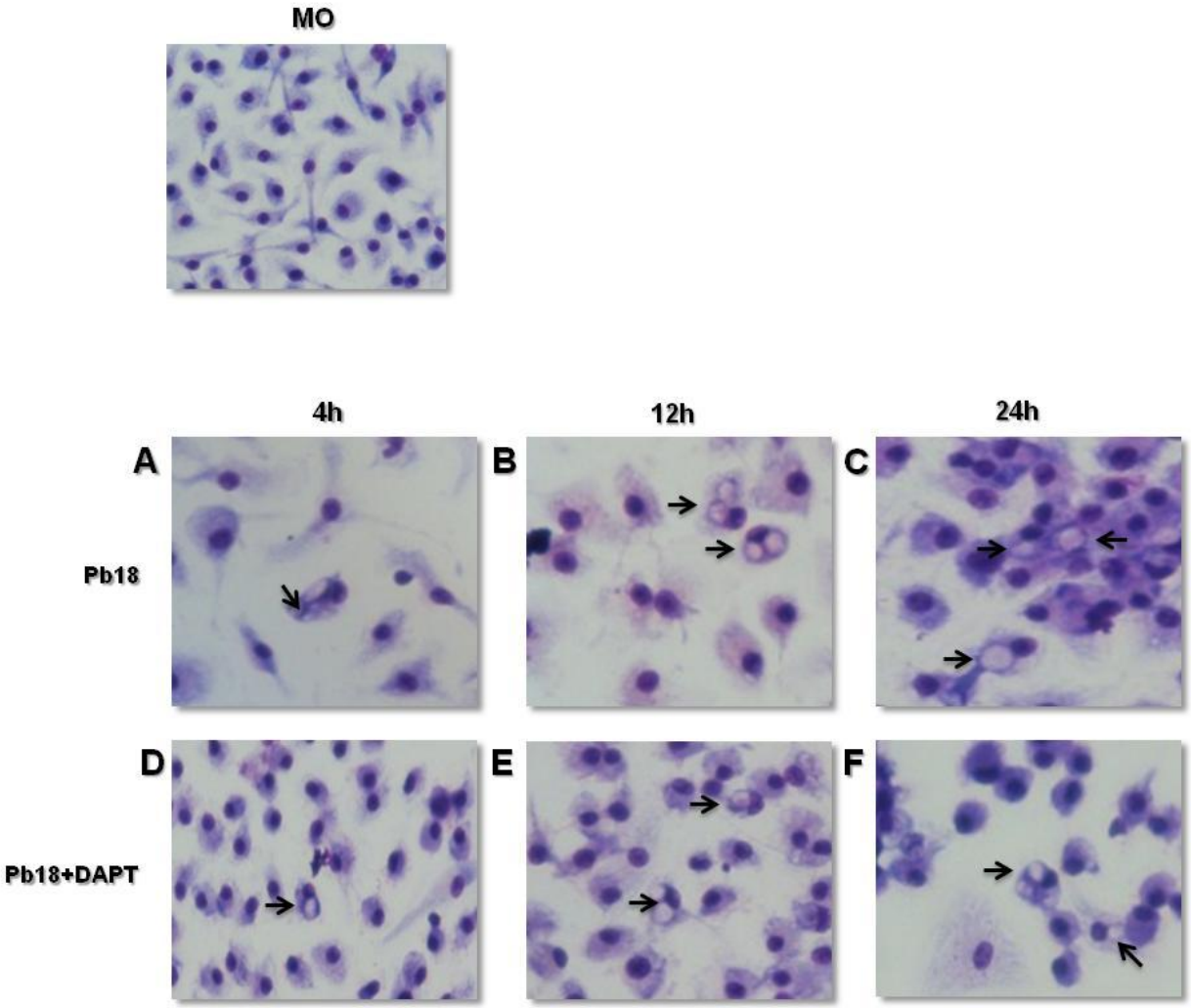

Figura 19. Fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs de camundongos C57BL/6 na presença ou ausência de DAPT, observada por microscopia. (A), (C) e (E) Perfil das células após 4, 12 e 24 horas (respectivamente) de interação com as leveduras na proporção (1:1). (B), (D) e (F) Perfil das células na presença de DAPT após 4, 12 e 24 horas (respectivamente) de interação com as leveduras na proporção (1:1). As setas apontam as leveduras internalizadas. Coloração de Giemsa. Aumento de 400x. Resultado representativo de três experimentos independentes.

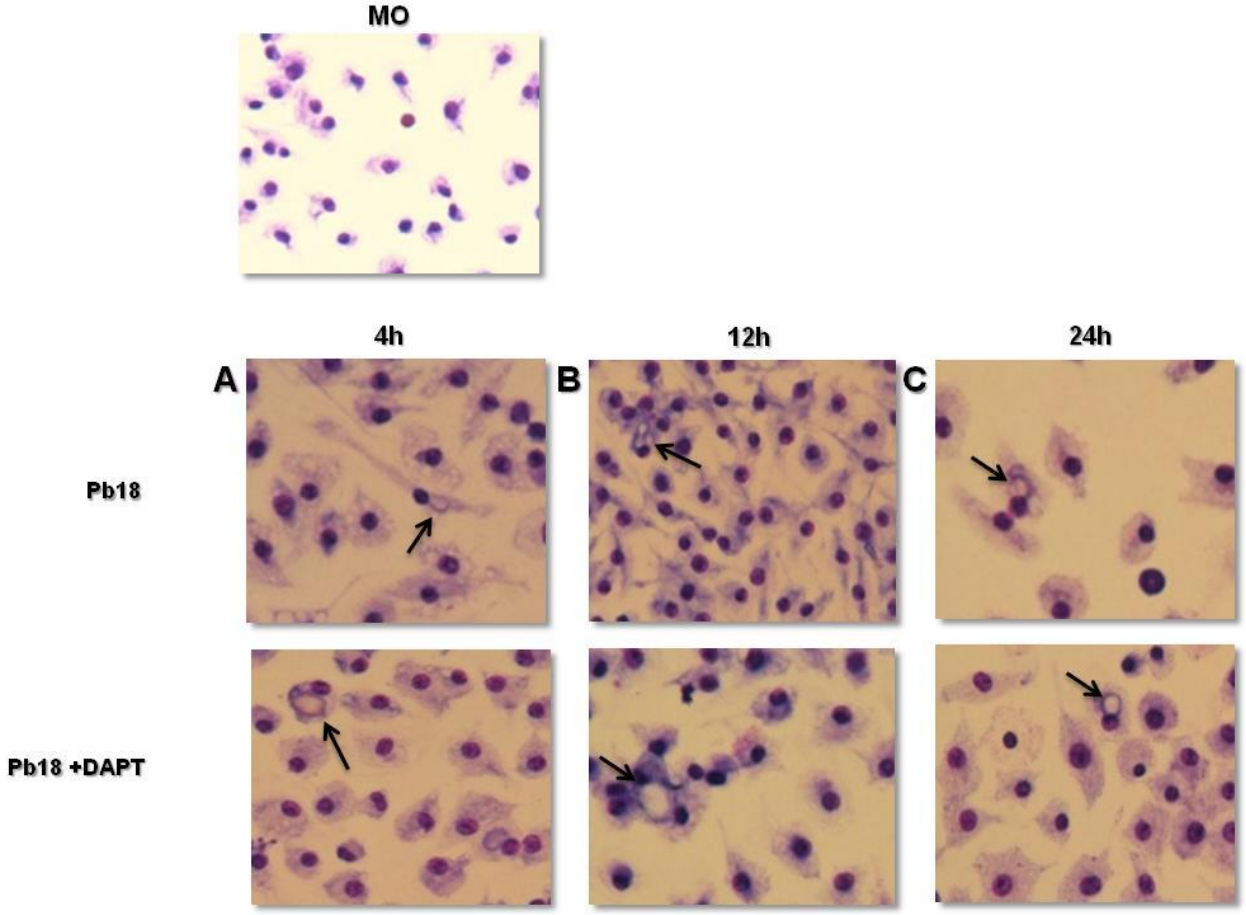

Figura 20. Fagocitose de leveduras de Pb18 por BMDMs de camundongos TLR 4$^{-/-}$ na presença ou ausência de DAPT, observada por microscopia. (A), (C) e (E) Perfil das células após 4, 12 e 24 horas (respectivamente) de interação com as leveduras na proporção (1:1). (B), (D) e (F) Perfil das células na presença de DAPT após 4, 12 e 24 horas (respectivamente) de interação com as leveduras na proporção (1:1). As setas apontam as leveduras internalizadas. Coloração de Giemsa. Aumento de 400x. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.3.3 Dosagem da produção da citocina IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas de interação entre macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e TLR 4$^{-/-}$ e leveduras do Pb18, na presença ou ausência de DAPT

Realizamos também a dosagem da produção de citocinas, principalmente IL-6 após a cinética de interação entre macrófagos e leveduras do Pb18. Na figura 22, verificamos que os macrófagos derivados de medula de ambos os camundongos apresentam baixos níveis de citocinas, tanto na presença quanto na ausência de DAPT. Apenas em 24 horas de interação, nos macrófagos dos camundongos controle (C57BL/6) que há um pico de produção de IL-6 na presença de DAPT, que condiz com o observado nos outros modelos. A dosagem de TNF-α apresentou resultados abaixo do limite de detecção.

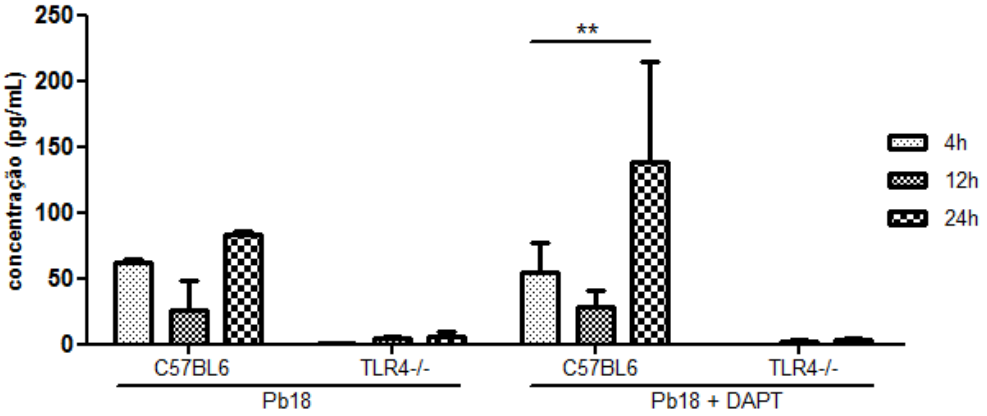

Figura 21. Perfil da secreção de IL-6 após interação de 4, 12 e 24 horas entre BMDMs e leveduras de Pb18. Decorrido os tempos de interação, o sobrenadante foi recolhido e mensuramos a produção de IL-6. Realizamos a técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo do fabricante, para mensuração dos níveis da citocinas IL-6 no sobrenadante do ensaio de cinética entre BMDMs e leveduras do Pb18. Resultado representativo de dois experimentos independentes, analisado pelo teste de Two-way ANOVA, Bonferroni posttest (**P<0,001). Resultado expresso em média de concentração (pg/mL) com desvio padrão da média.

4.4 Ensaios de tratamento com DAPT em camundongos BALB/c

Nossos resultados em modelos *in vitro* mostraram-se muito promissores, com diminuição da carga fúngica. Então, veio à pergunta: Se tratássemos camundongos com o inibidor da sinalização Notch antes de realizarmos a infecção, a carga fúngica diminuirá? Esse tratamento terá algum efeito na imunidade dos camundongos?

Para responder essas perguntas, realizamos um protocolo de tratamento com esse inibidor. O tratamento foi baseado nos trabalhos de McGowan e colaboradores (2011), Jin e colaboradores (2011) e Maeda e colaboradores (2007) para montarmos nosso protocolo de tratamento, descrito em material e métodos.

4.4.1 Análise das unidades formadoras de colônias de pulmões de camundongos tratados com DAPT após 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção

Após os tempos de infecções, os camundongos foram eutanasiados e coletamos os pulmões para realizarmos os ensaios de UFC.

Nossos resultados demonstram que os camundongos tratados com DAPT apresentaram diminuição da carga fúngica após 24 horas de infecção e principalmente após 45 dias de infecção.

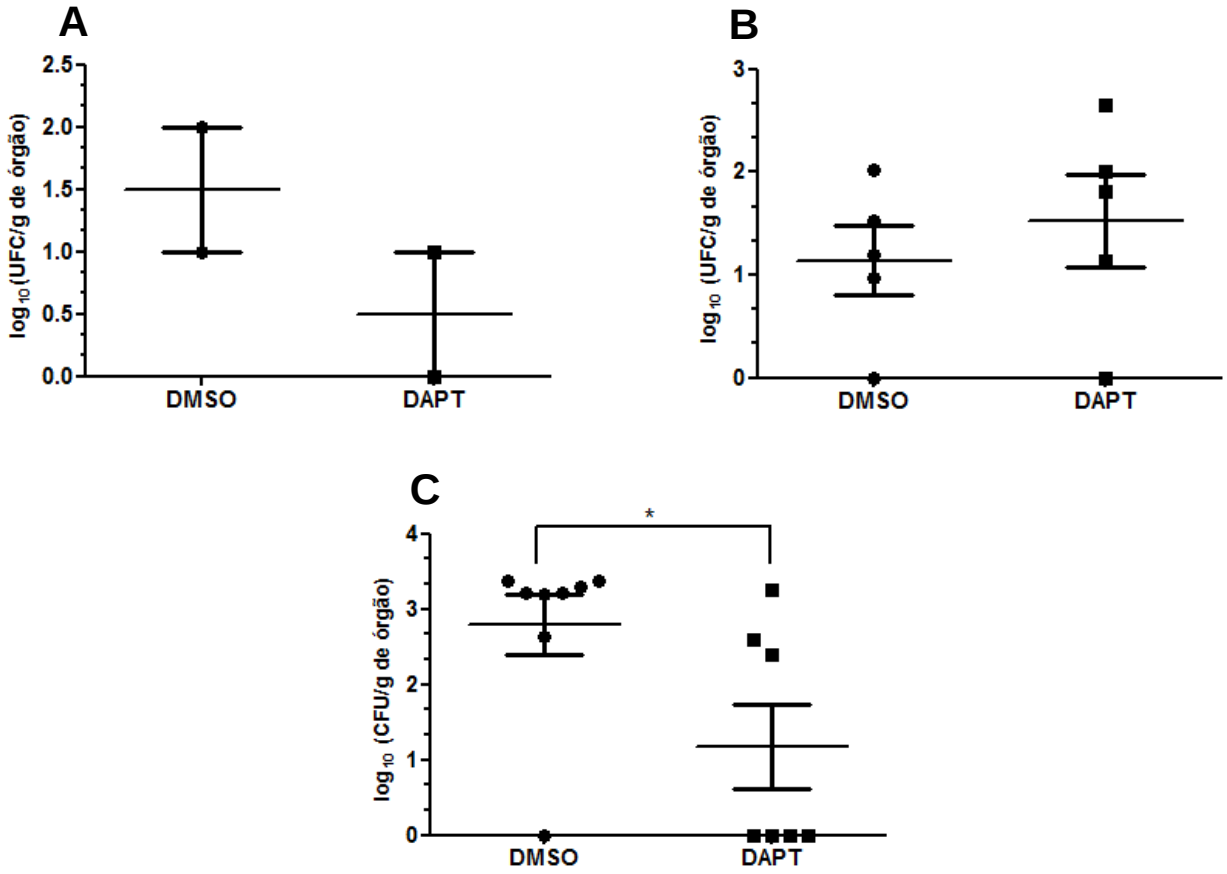

Figura 22. Unidades formadoras de colônias dos pulmões de camundongos BALB/c tratados com DAPT por 15 dias e infectados com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias. Camundongos BALB/c foram tratados intraperitonealmente com DAPT por 15 dias e depois infectados com $1x10^6$ de leveduras de Pb18. Após 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção os animais foram eutanasiados e obtidos os pulmões para analise das unidades formadoras de colônias**. (A) Unidades formadoras de colônias após 24 horas de infecção, com n=2. (B) Unidades formadoras de colônias após 20 dias de infecção, com n=6. (C) Unidades formadoras de colônias após 45 dias de infecção, com n=8 no grupo DMSO e n=7 no grupo DAPT.** Resultado apresentado como média de 3 experimentos independentes, analisados pelo teste t, unpaired t test com Welch's correction (P<0,05).

4.4.2 Perfil das células pulmonares após tratamento com DAPT e infecção com leveduras de Pb18 por 20 dias

Conhecer o perfil de células presentes no pulmão, principal órgão da PCM, é extremamente importante para sabermos como o sistema imune está agindo contra o fungo. Como podemos obervar nas figuras 23 e 24, o grupo tratado com DAPT apresenta maior porcentagem de células $CD11b^+$ no pulmão, após 20 dias de infecção. Isso pode indicar que o tratamento induz ao aumento de possivelmente macrófagos, células importantes no controle da infecção por Pb18.

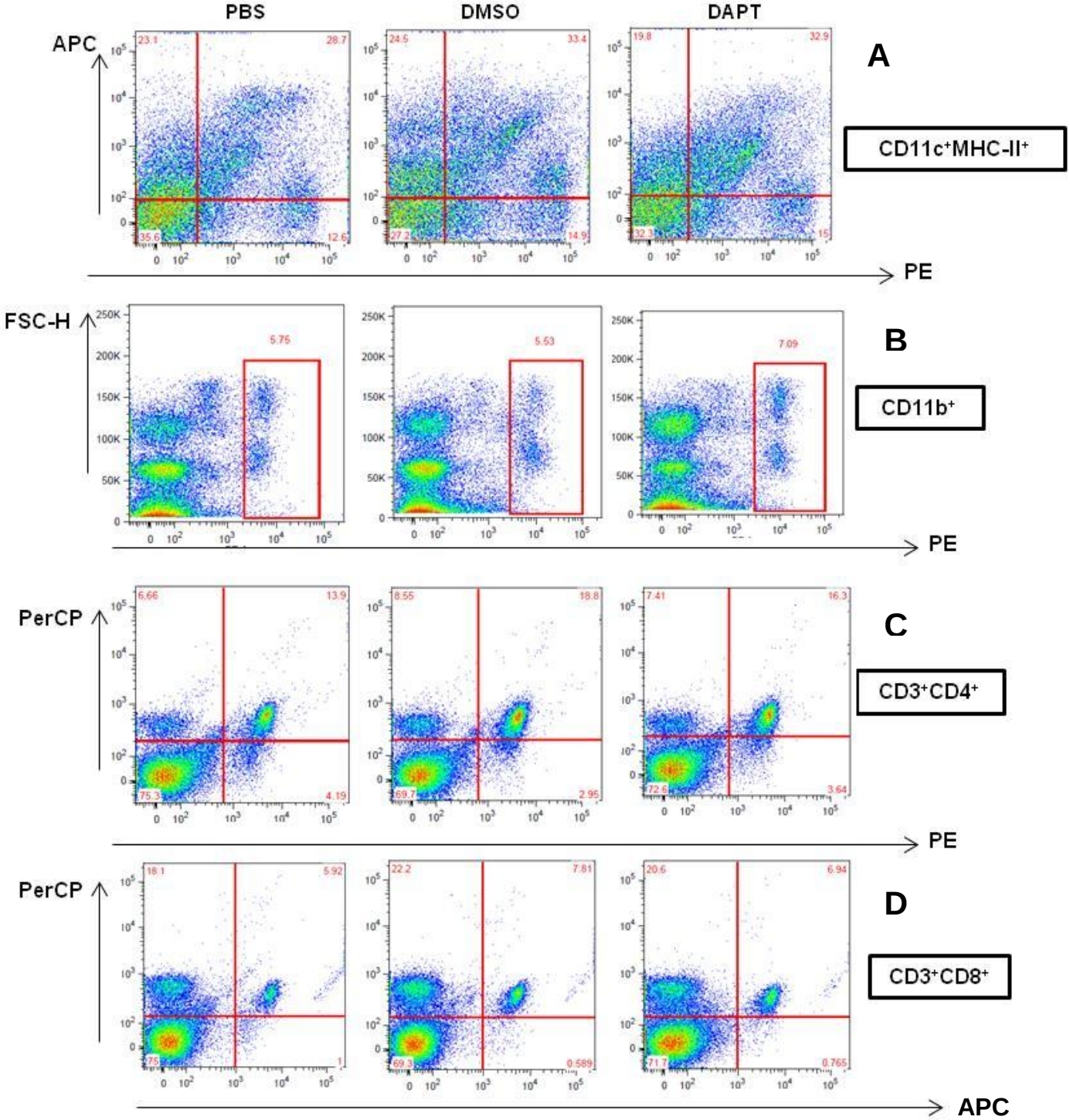

Figura 23. Perfil das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com $1x10^6$ leveduras do Pb18 ou PBS por 20 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-CD11b (PE), (C) anti-CD3 (PerCP), anti-CD4 (PE), anti-CD8 (APC).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisado pelo software FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

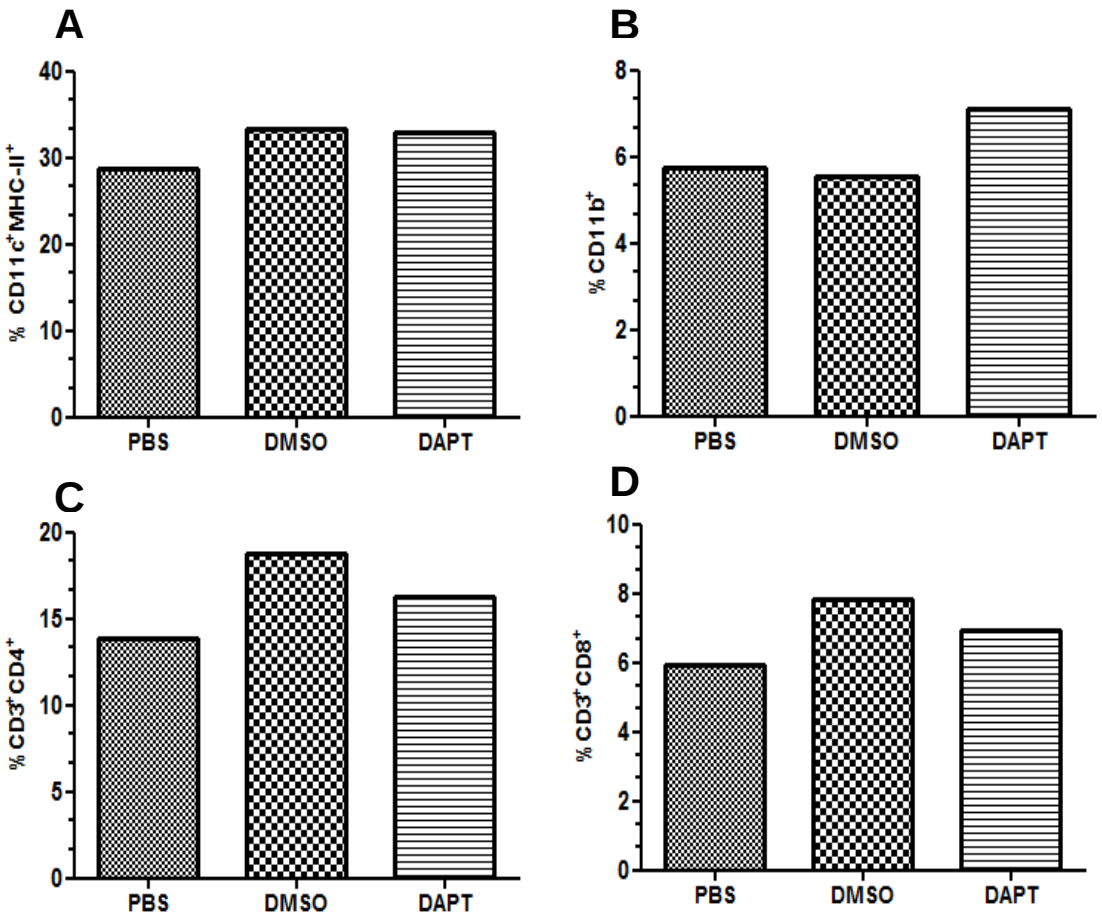

Figura 24. Porcentagem das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 20 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-CD11b (PE), (C) anti-CD3 (PerCP), anti-CD4 (PE), anti-CD8 (APC).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo e expressos em mediana. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

4.4.3 Perfil das células T dos linfonodos após tratamento com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras de Pb18

Durante o processo infeccioso, os linfócitos estão em plena proliferação nos linfonodos. Com isso, analisamos o perfil desses linfócitos presentes nos linfonodos regionais, axilares e paratimicos. Conforme figura 25 e 26, podemos verificar que após 20 dias de infecção, os animais tratados apresentaram um pequeno aumento de células $CD3^+CD4^+$, quando comparadas com animal não tratado e infectado (DMSO). E em relação às células $CD3^+CD8^+$ quase não há alteração na porcentagem em ambos os grupos.

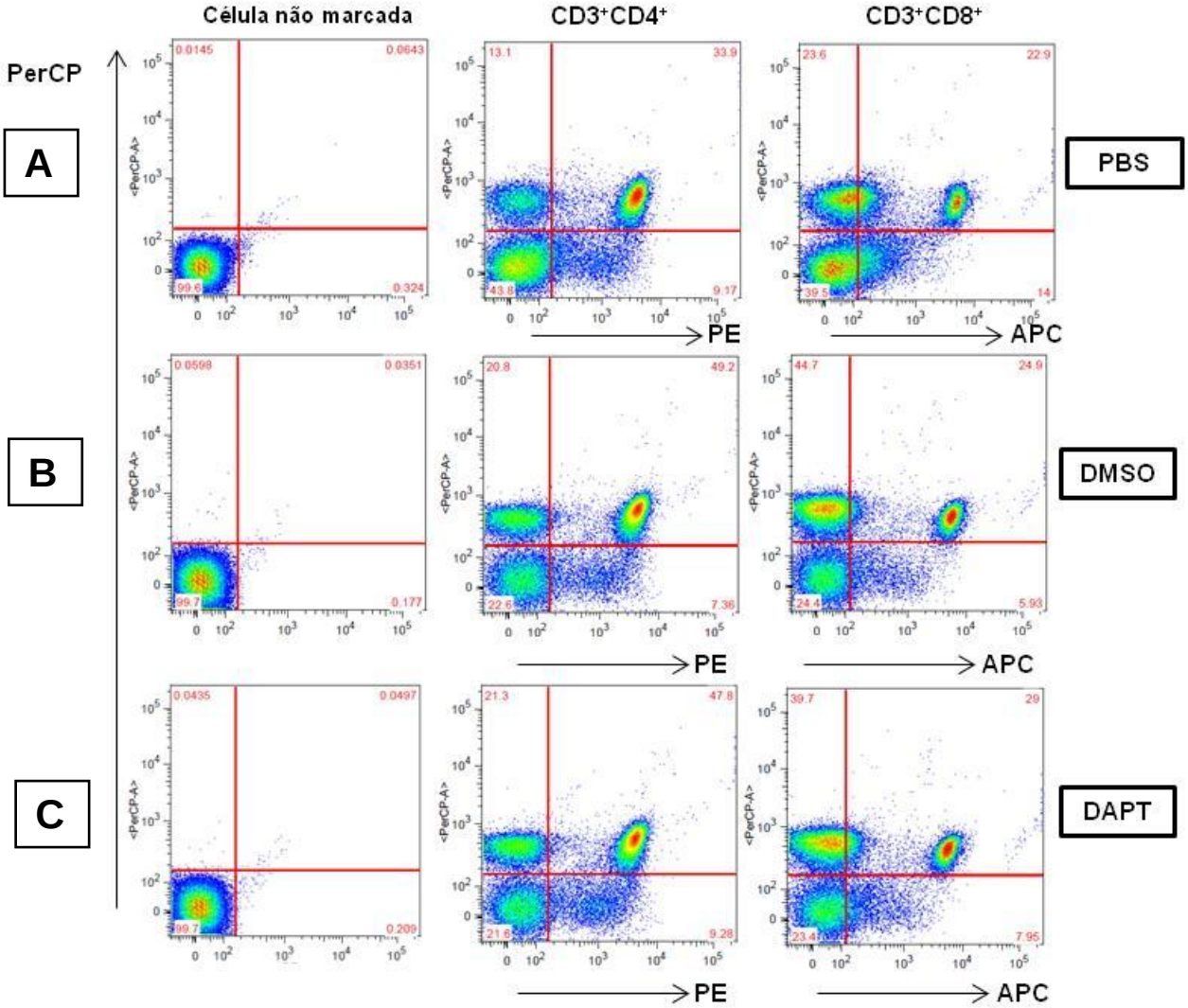

Figura 25. Perfil das células T dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 20 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com anti-CD3 (PercP), anti-CD4 (PE), anti-CD8(APC). (**A) Grupo PBS. (B) Grupo DMSO e (C) Grupo DAPT.** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisado pelo software FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

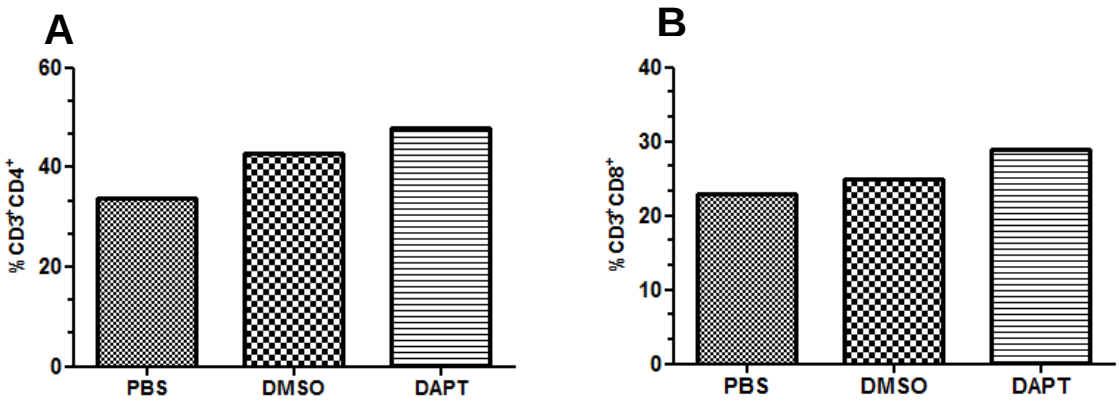

Figura 26. Porcentagem das células T dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 20 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 20 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com anti-CD3 (PerCP), anti-CD4 (PE), anti-CD8 (APC). **(A) Porcentagem de células $CD3^+CD4^+$. (B) Porcentagem de células $CD3^+CD8^+$**. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo e expressos em mediana. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

4.4.4 Perfil das células pulmonares após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção por 45 dias com leveduras de Pb18

O perfil das células presentes no pulmão após 45 dias de infecção também foi analisado, para verificarmos se havia diferenças entre os grupos (tratado-DAPT e não tratado-PBS). Nas figuras 27 e 28, podemos constatar que apenas as células $CD11b^+F4/80^+$ ainda estão em maior quantidade mesmo após 45 dias de infecção, no grupo tratado (DAPT).

Em relação às outras células, $CD11c^+MHC\text{-}II^+$ e $NK1.1^+$ estão em menor quantidade tanto no grupo não tratado e infectado (DMSO) quanto no grupo tratado (DAPT), quando comparamos com o grupo não infectado (PBS).

Já as células $Ly6C\text{-}Ly6G^+$ apresentam menor quantidade apenas no grupo tratado. Ambos os grupos controle não infectado (PBS) e não tratado e infectado (DMSO) apresentam níveis muito similares dessas células.

Isso indica um perfil de células menos ativadas visto que a doença está evoluindo para cura, e diminuindo a inflamação dos pulmões.

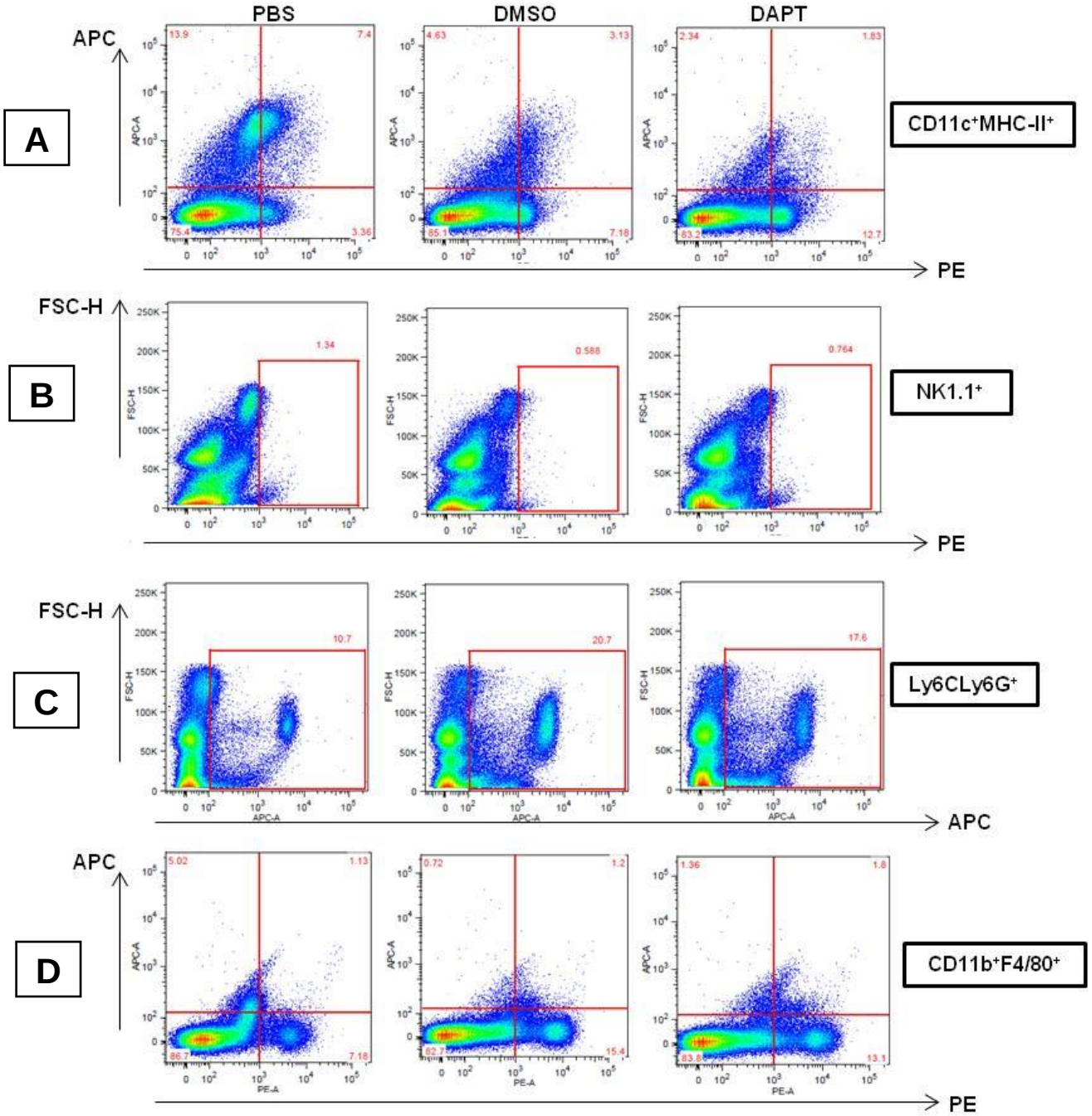

Figura 27. Perfil das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 45 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-NK1.1 (PE), (C) anti-Ly6C and Ly6G (APC), (D) anti-CD11b (PE).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO) e analisado pelo software FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

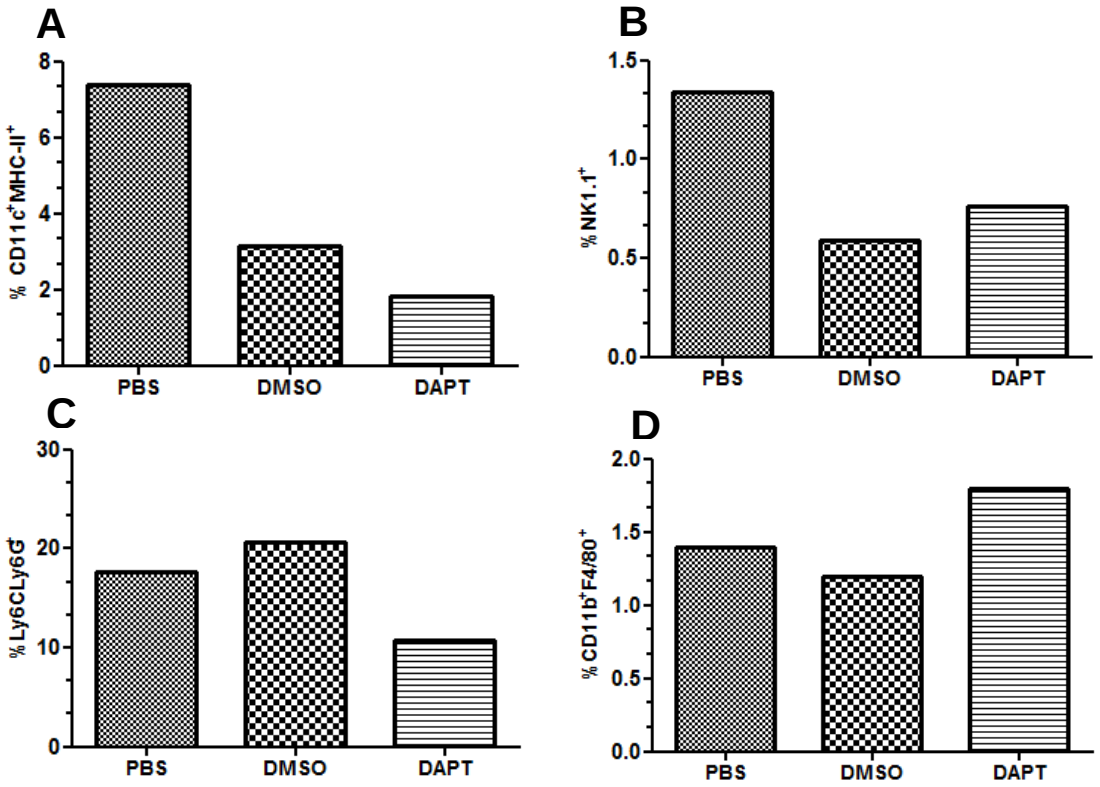

Figura 28. Porcentagem das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 45 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-NK1.1 (PE), (C) anti-Ly6C and Ly6G (APC), (D) anti-CD11b (PE).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo e expressos em mediana. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

4.4.5 Perfil de citocinas no pulmão após tratamento com DAPT e infecção com leveduras de Pb18 por 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção

O perfil de citocinas é extremamente importante no desenvolvimento da resposta imunológica. Dado essa importância, verificamos se havia diferença na produção do perfil de citocinas nos pulmões dos animais tratados e não tratados. As citocinas dosadas foram IL-6, TNF-α, IL-17, IL-10, IFN-γ e IL-1β.

Nossos resultados (figura 29) evidenciam que com o tratamento, após 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção há diminuição de IL-6, o que era esperado. Percebe-se também diminuição de IL-17 e TNF-α com o tratamento após 20 dias e 45 dias de infecção. Quase não há produção de IL-10 e de IFN-γ. A produção de IL-1β também apresenta diminuição após 20 dias e 45 dias de infecção, mas o grupo tratado (DAPT) tem mais produção dessa citocina do que o grupo não tratado. Isso evidencia que com 20 dias os animais tratados já começam a apresentar um perfil de regulação da resposta imune, com diminuição da produção de citocinas e esse perfil se acentua mais com 45 dias pós infecção. Dessa forma, o tratamento com DAPT parece contribuir com a melhora do quadro dos camundongos.

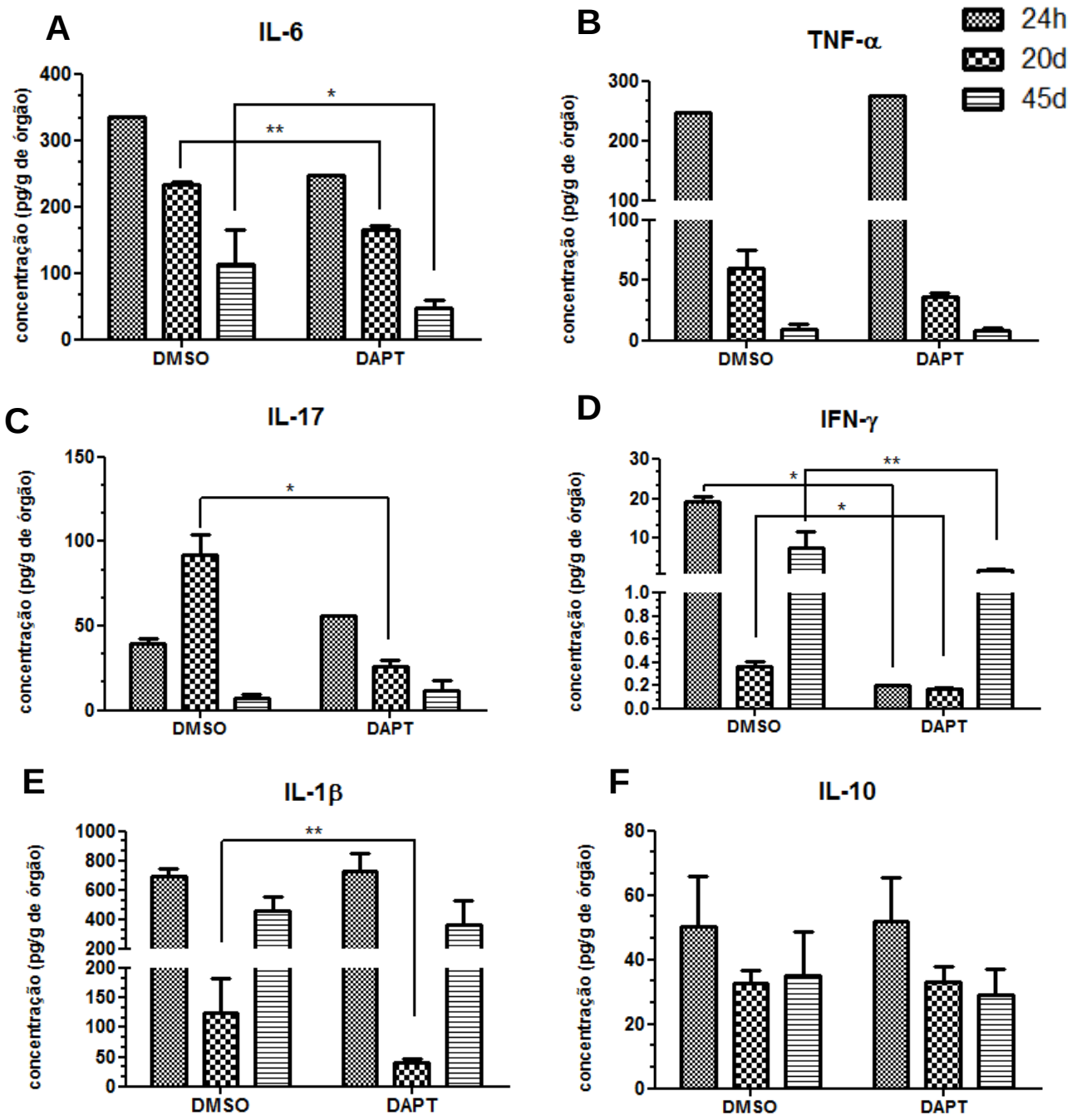

Figura 29. Perfil de produção de citocinas dos pulmões de camundongos BALB/c tratados com DAPT por 15 dias e infectados por 24 horas, 20 dias e 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Aplicação da técnica de ELISA de captura para mensuração dos níveis de citocinas no sobrenadante do pulmão. **(A) Perfil da produção de IL-6 nos pulmão dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 24 horas e 20 dias de infecção. (B) Perfil da produção de TNF-α nos pulmão dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 24 horas e 20 dias de infecção. (C) Perfil da produção de IL-17 nos pulmões dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 24 horasoras e 20 dias de infecção. (D) Perfil da produção de IFN-γ nos pulmão dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 24 horas e 20 dias de infecção. (E) Perfil da produção de IL-1β nos pulmão dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 24 horas e 20 dias de infecção. (F) Perfil da produção de IL-10 nos pulmão dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 24 horas e 20 dias de infecção.** Resultados representativos de dois experimentos. Resultados expressos em mediana dos dados e analisados por teste Two-Way ANOVA, bonferroni posttest, onde *p<0,05 e **p<0,01. (n=7)

4.4.6 Dosagem de títulos IgG total e isotipos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção de 24 horas, 20 dias e 45 dias com leveduras do Pb18

Para avaliarmos a resposta humoral induzida quando realizamos o tratamento com DAPT, obtivemos o sangue dos animais por punção intracardíaca, separamos o soro por centrifugação e por fim dosamos os títulos de IgG total e os isotipos IgG1 e IgG2a por ELISA.

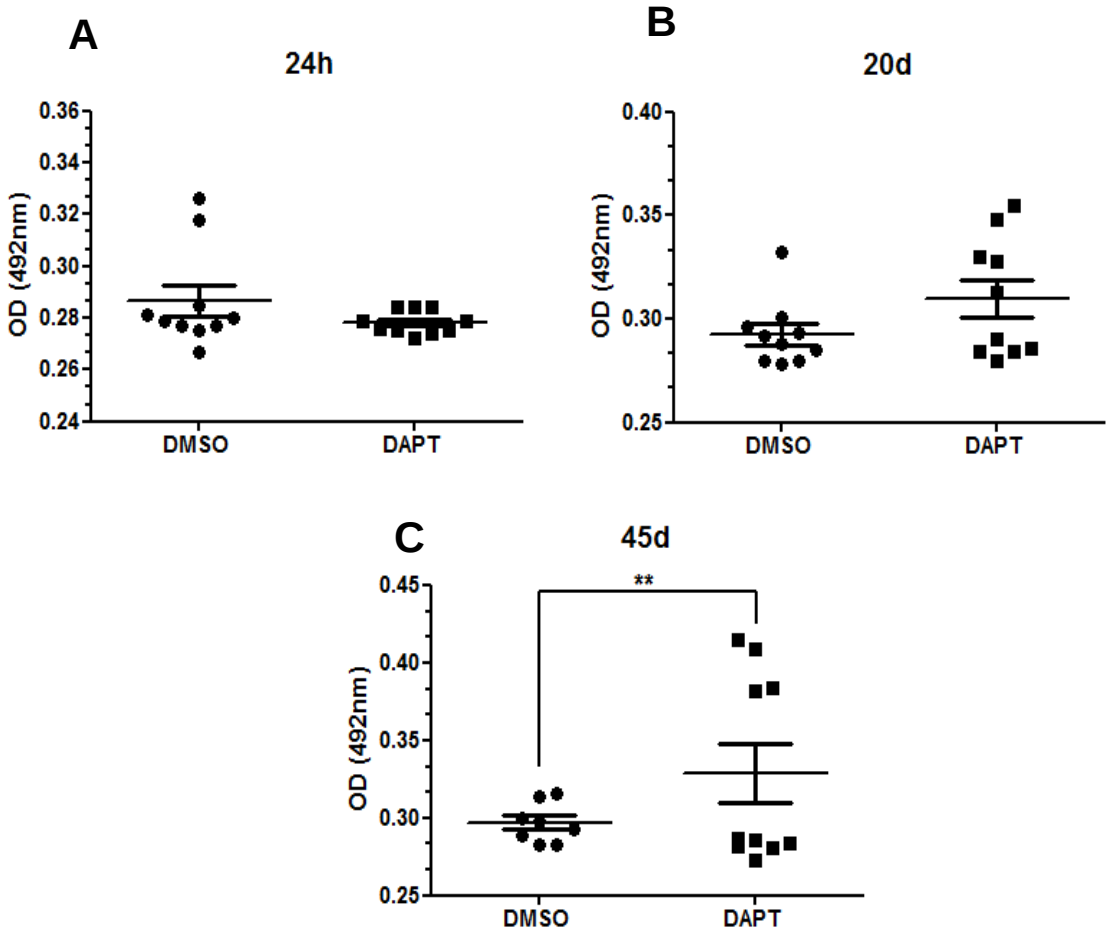

Figura 30. Produção de IgG total após tratamento intraperitoneal de 15 dias com DAPT seguida de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias. Decorrido o período de tratamento e de infecção podemos observar aumento da densidade óptica de IgG total. Após 15 dias de tratamento com inibidor e 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção, o soro dos animais foi obtido e a dosagem de IgG foi realizada na diluição 1:50 e na presença de 4mg de CFA (antígeno livre de parede do fungo**). (A) Infecção por 24 horas. (B) Infecção por 20 dias. (C) Infecção por 45 dias.** Resultado expresso em mediana da densidade óptica, com desvio padrão da média de três experimentos independentes, analisados por test t, paired test onde ** p<0,005.

Nossos resultados (figura 30) indicam que com o tratamento, e após principalmente 45 dias de infecção há aumento dos títulos de anticorpos, indicando que houve uma ativação da resposta humoral com aumento da produção de anticorpos contra o Pb18.

Assim, realizamos a isotipagem desses anticorpos (figuras 31 e 32). Podemos observar que após 20 dias de infecção, no grupo tratado com DAPT há aumento dos títulos de IgG1, e que esse aumento se mantém por 45 dias. Em relação a IgG2a (figura 32), podemos obervar apenas um aumento em 20 dias de infecção do grupo tratado com DAPT, após esse período, os título de IgG2a ficam similares em ambos os grupos.

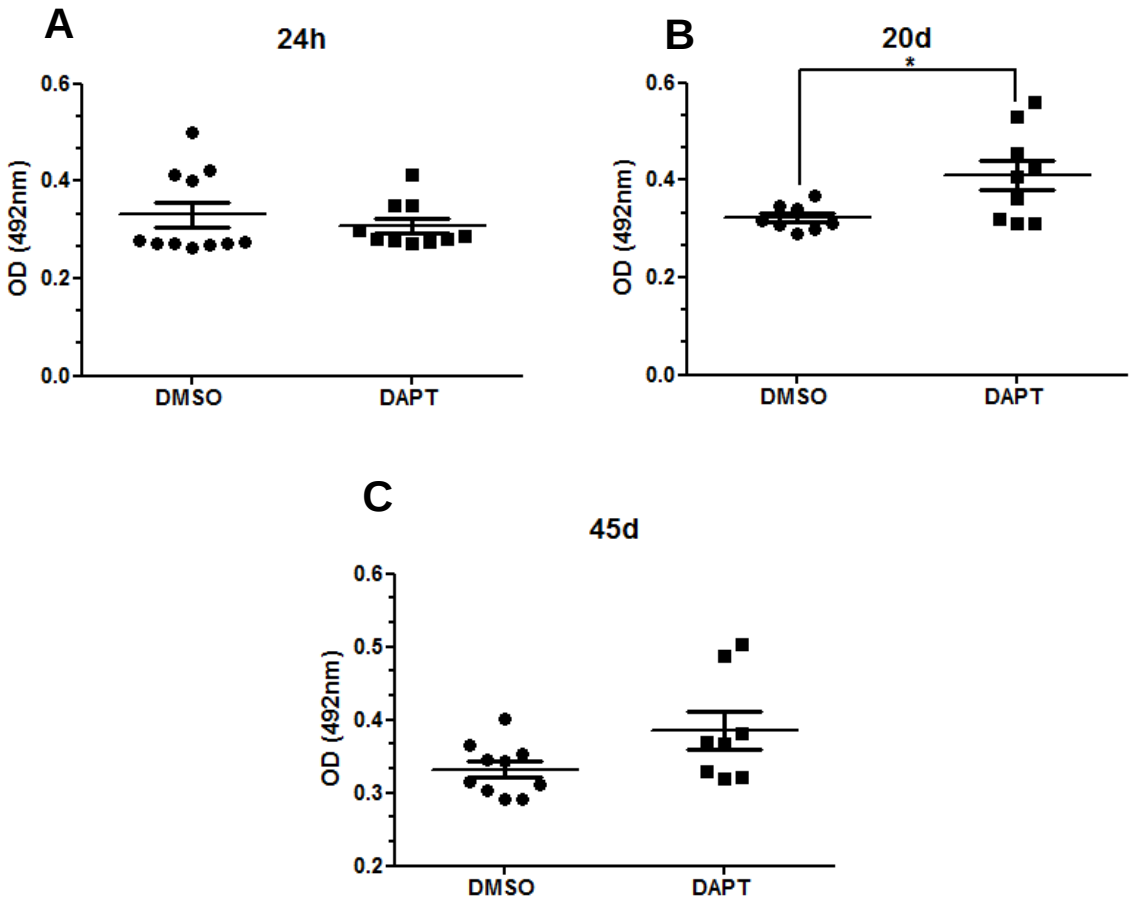

Figura 31. Isotipos de IgG1 após tratamento intraperitoneal de 15 dias com DAPT seguida de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias. Decorrido o período de tratamento e de infecção podemos observar aumento da densidade óptica de IgG 1. Após 15 dias de tratamento com inibidor e 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção, o soro dos animais foi obtido e a dosagem dos isotipos de IgG1 foi realizada na diluição 1:50 e na presença de 4mg de CFA (antígeno livre de parede do fungo). **(A) Infecção por 24 horas. (B) Infecção por 20 dias. (C) Infecção por 45 dias.** Resultado expresso em mediana da densidade óptica, com desvio padrão da média de três experimentos independentes, analisados por test t, paired test onde * $p<0,05$.

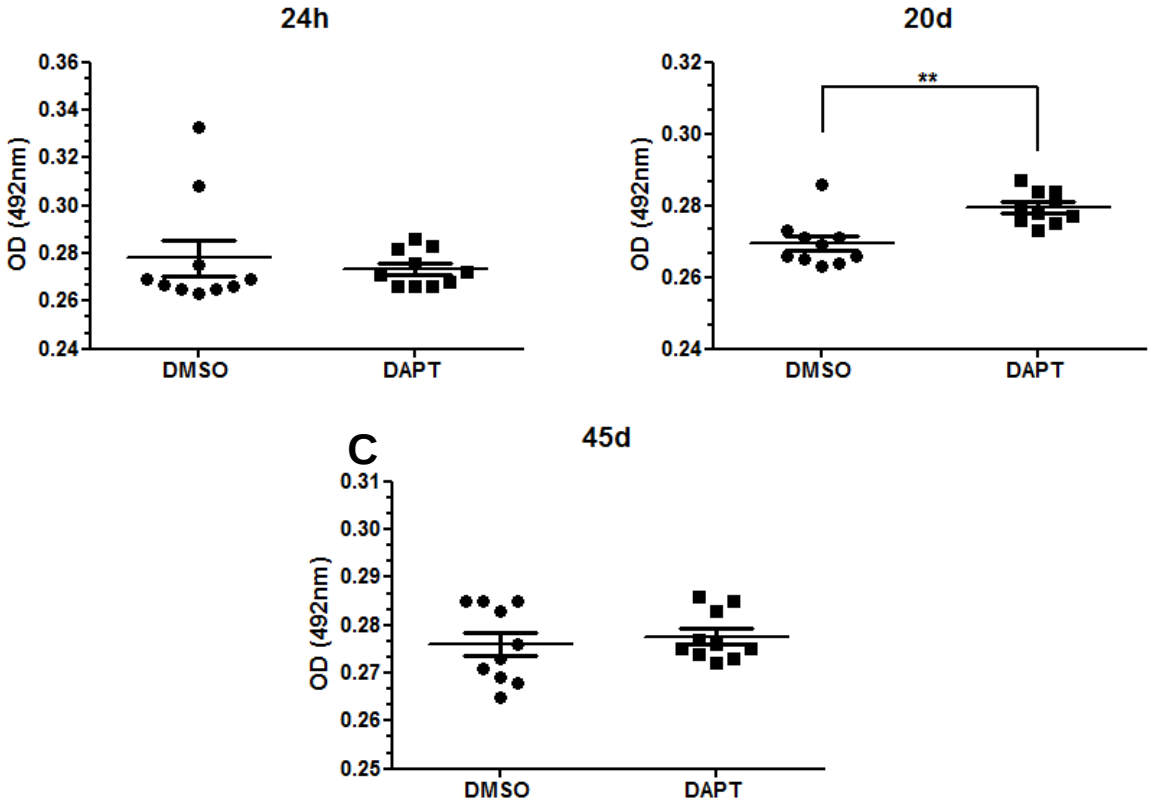

Figura 32. Isotipos de IgG2a após tratamento intraperitoneal de 15 dias com DAPT seguida de infecção intratraqueal com leveduras de Pb18 (10^6) por 24 horas, 20 dias e 45 dias. Após 15 dias de tratamento com inibidor e 24 horas, 20 dias e 45 dias de infecção, o soro dos animais foi obtido e a dosagem dos isotipos de igG2a foi realizada na diluição 1:50 e na presença de 4mg de CFA (antígeno livre de parede do fungo). **(A) Infecção por 24 horas. (B) Infecção por 20 dias. (C) Infecção por 45 dias.** Resultado expresso em mediana da densidade óptica, com desvio padrão da média de três experimentos independentes, analisados por test t, paired test onde ** p<0,005.

4.4.7 Ensaio de Linfoproliferação

Este ensaio foi realizado para verificarmos se o tratamento nos camundongos interfere na capacidade de proliferação dos linfócitos. Para isso, os camundongos foram tratados de acordo com o protocolo descrito anteriormente e infectados com $1x10^6$ de leveduras de Pb18. Decorrido 20 dias de infecção, retiramos os baços desses animais e realizamos o ensaio de linfoproliferação.

Nós verificamos de acordo com a figura 33, que o tratamento com DAPT não interfere na capacidade de proliferação de células T, visto que na presença de phitohemaglutinina ocorre a proliferação, tanto de células T $CD4^+$ quanto de células T $CD8^+$. Entretanto, podemos observar também a proliferação com estímulo específico (CFA) existe, mas quase não há diferença entre os grupos tratado e não tratado. E a proliferação apresentou um perfil com mais células T $CD8^+$ do que células $TCD4^+$.

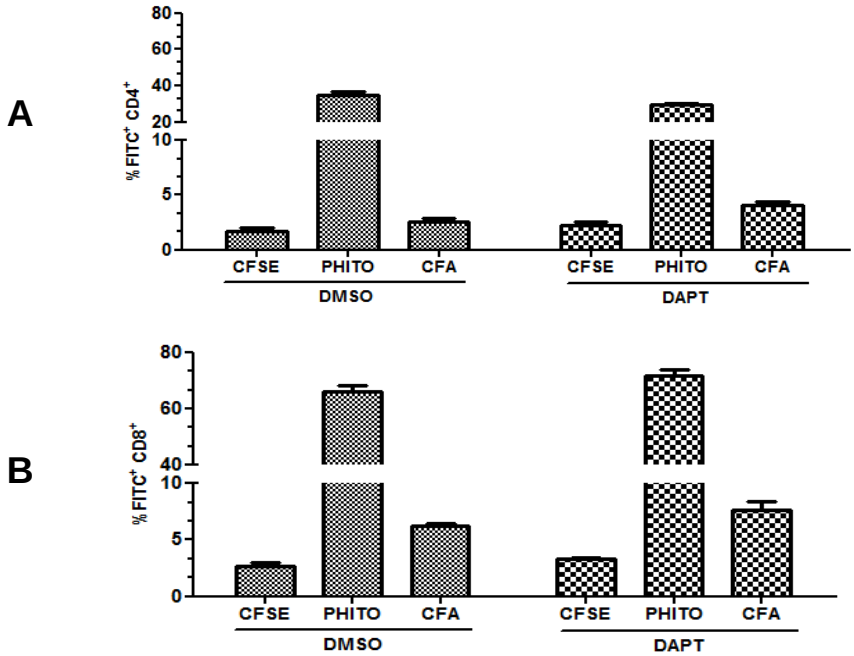

Figura 33. Ensaio de linfoproliferação com esplenócitos de baço de camundongos tratados (DAPT) e não tratados (DMSO), infectados com leveduras de Pb18 (10^6) por 20 dias. Os camundongos foram tratados intraperitonealmente com DAPT ou veículo e infectados com $1x10^6$ de leveduras de Pb18 por 20 dias. Decorrido o tempo de infecção, os esplenócitos foram marcados com CFSE e estimulados com phitohemaglutinina (controle positivo) e CFA do Pb18. Após 5 dias de incubação, a linfoproliferação das células foi avaliada por meio da diminuição da fluorescência utilizando de citometria de fluxo, no citômetro FACS CANTO, e analisado pelo software FlowJo. Resultado expresso em mediana da porcentagem de células $FITC^+$. (**A) Porcentagem de células $FITC^+CD4^+$. (B) Porcentagem de células $FITC^+CD8^+$.** Resultado analisado por Two-way ANOVA, boferroni post-test. Resultados representativos de um experimento.

4.4.8 Dosagem de IFN-γ após ensaio de linfoproliferação

Após realizarmos o ensaio de linfoproliferação, recolhemos o sobrenadante para verificarmos as citocinas que foram produzidas. Entretanto, devido a pequena quantidade de sobrenadante que havia (200 μL), conseguimos apenas dosar IFN-γ e IL-17. Em relação a IL-17, os resultados ficaram abaixo do limiar de detecção.

Conforme figura 34, observa-se que quase não há produção de IFN-γ quando as células são estimuladas com o antígeno específico do fungo Pb18, apenas há produção dessa citocina na presença do estímulo positivo (phitohemaglutinina).

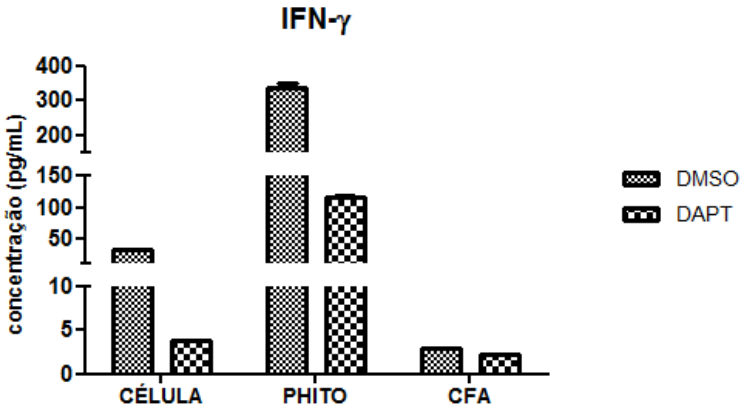

Figura 34. Dosagem de IFN-γ após proliferação dos linfócitos por 5 dias. O ensaio de linfoproliferação foi realizado conforme descrito anteriormente, e recolhemos os sobrenadantes para dosagem de citocinas por meio da técnica de ELISA de captura, de acordo com protocolo do fabricante. Resultado representativo de um experimento, analisado pelo teste de Two-Way ANOVA, Bonderroni posttest. Resultado expresso em média de concentração (pg/mL) com desvio padrão da média (P<0,001).

4.5 Ensaios de tratamento com DAPT em camundongos BALB/c NUDE

Como observamos que o tratamento com DAPT (bloqueio da via de Notch) em camundongos BALB/c diminuiu a carga fúngica nos pulmões após 45 dias de infecção, nos veio a seguinte pergunta: será que essa diminuição de carga fúngica observada nos pulmões após 45 dias de infecção é dependente ou independente de linfócitos T?

Para responder essa pergunta, realizamos o mesmo tratamento em camundongos BALB/c NUDE, pois estes possuem o timo atrofiado e por consequência ausência de linfócitos T.

4.5.1 Análise das unidades formadoras de colônias de pulmões de camundongos tratados com DAPT após 45 dias de infecção

Após o tempo de infecção, os camundongos foram eutanasiados e coletamos os pulmões para realizarmos os ensaios de UFC.

Nossos resultados demonstram que os camundongos tratados com DAPT não apresentaram diminuição da carga fúngica após 45 dias de infecção (figura 35).

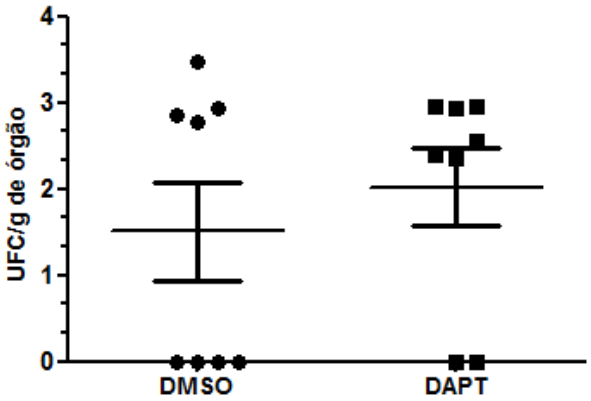

Figura 35. Unidades formadoras de colônias dos pulmões de camundongos BALB/c NUDE tratados com DAPT por 15 dias e infectados com leveduras de Pb18 (10^6) por 45 dias. Camundongos BALB/c NUDE foram tratados intraperitonealmente com DAPT por 15 dias e depois infectados com 10^6 de leveduras de Pb18. Após 45 dias de infecção os animais foram eutanasiados e obtidos os pulmões para analise das unidades formadoras de colônias. Unidades formadoras de colônias após 45 dias de infecção, com n=5. Resultado apresentado como mediana dos valores e representativo de um experimento independente, analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

4.5.2 Perfil das células pulmonares após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção por 45 dias com leveduras de Pb18

O perfil das células presentes no pulmão de camundongos BALB/c NUDE após 45 dias de infecção foi analisado, para verificarmos se havia diferenças entre as linhagens de camundongos, assim como, diferença entre o perfil das células após o tratamento.

O perfil celular das células do pulmão dos camundongos BALB/c NUDE é diferente do observado nos camundongos BALB/c. Esses animais possuem mais células $CD19^+$, provavelmente como forma de compensar a falta de células T. Conforme figura 36 e 37, podemos observar que não há diferença entre a porcentagem de células entre os camundongos tratados (DAPT) e não tratados (DMSO), logo apresentam um perfil de células similar.

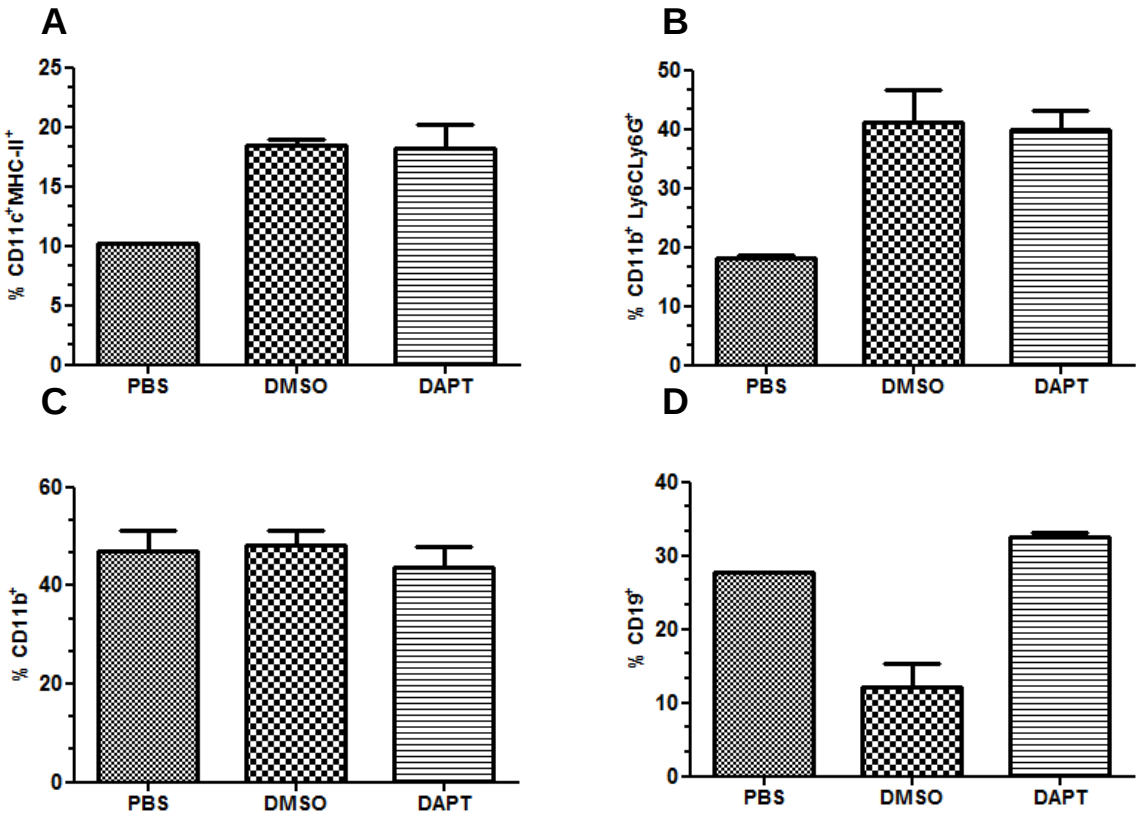

Figura 36. Porcentagem das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c NUDE foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 45 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-CD11b (PE), anti- Ly6C and Ly6G (APC), (C) anti-CD11b (FITC), (D) anti-CD19 (PE).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo e expressos em mediana. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

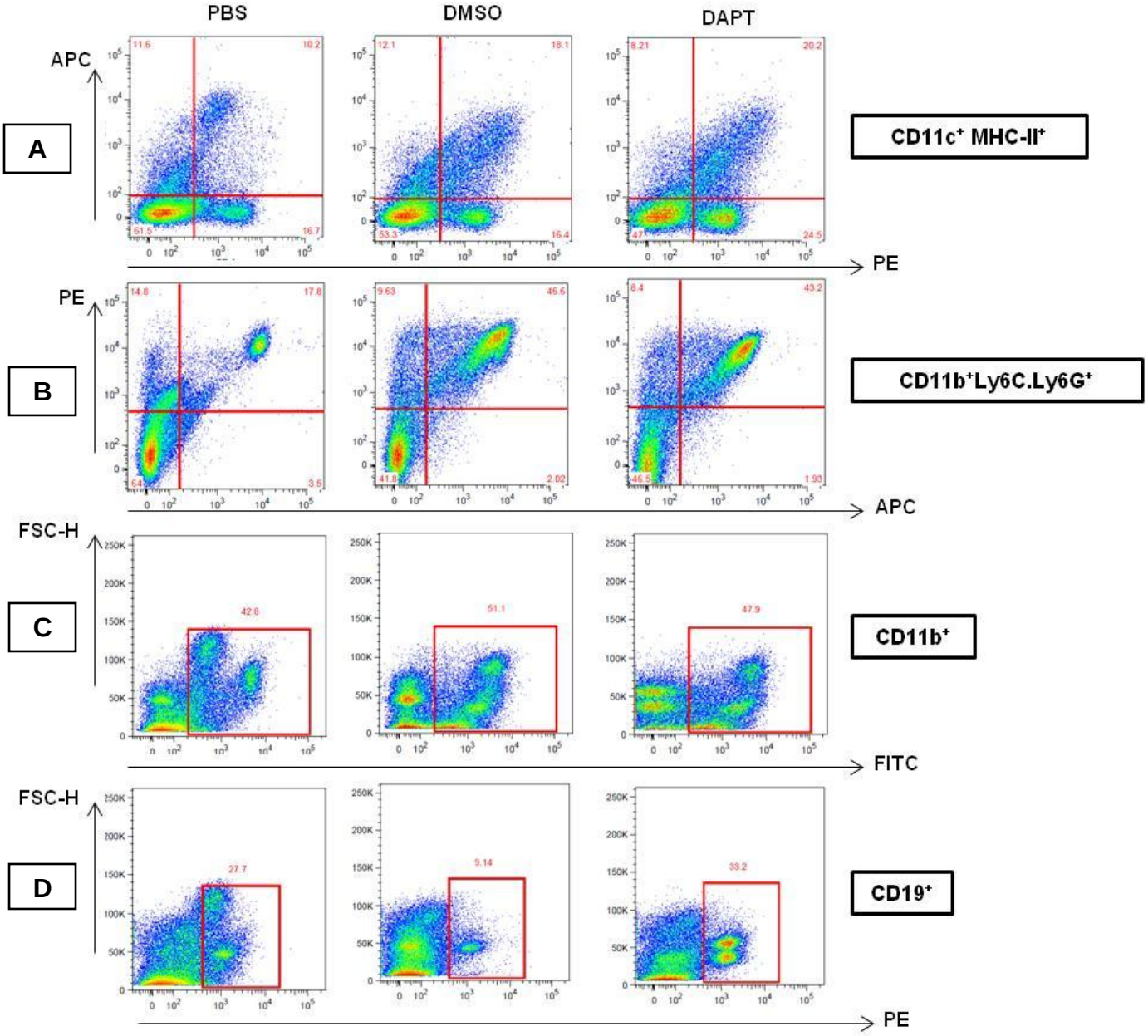

Figura 37. Perfil das células pulmonares após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c NUDE foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 45 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-CD11b (PE), anti- Ly6C and Ly6G (APC), (C) anti-CD11b (FITC), (D) anti-CD19 (PE).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

4.5.3 Perfil das células dos linfonodos axilares e paratímicos após tratamento com DAPT por 15 dias e infecção por 45 dias com leveduras de Pb18

Também realizamos a análise do perfil celular presente nos linfonodos dos camundongos BALB/c NUDE, a fim de verificarmos se existe diferença entre as linhagens de camundongos e também se o tratamento com DAPT interfere nesse perfil.

De acordo com a figura 38 e 39, verificamos que não há diferença de porcentagem de células entre ambos os grupos, tratado (DAPT) e não tratado (DMSO), demonstrando que o tratamento não interfere no perfil de células dos linfonodos.

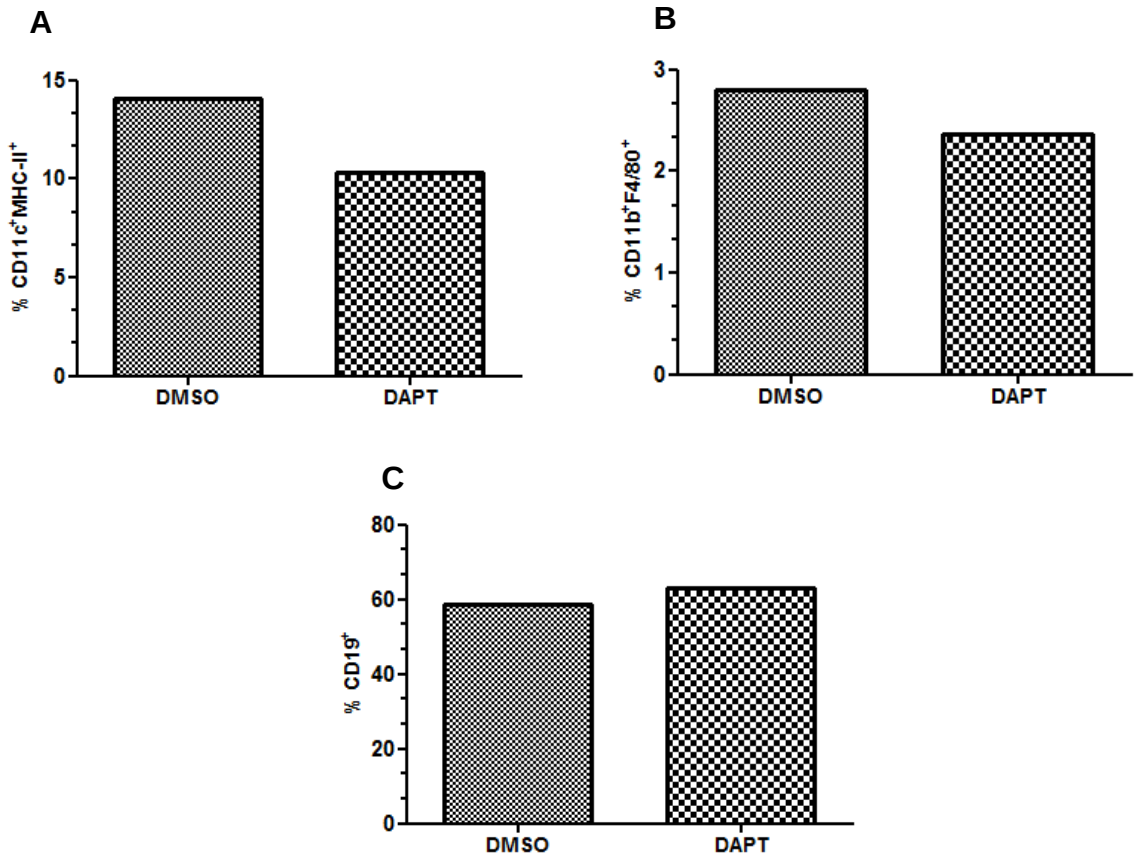

Figura 38. Porcentagem das células dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c NUDE foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 45 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos linfonodos foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com (**A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-CD11b (FITC) F4/80 (APC), (C) anti-CD19 (PE).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo e expressos em mediana. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

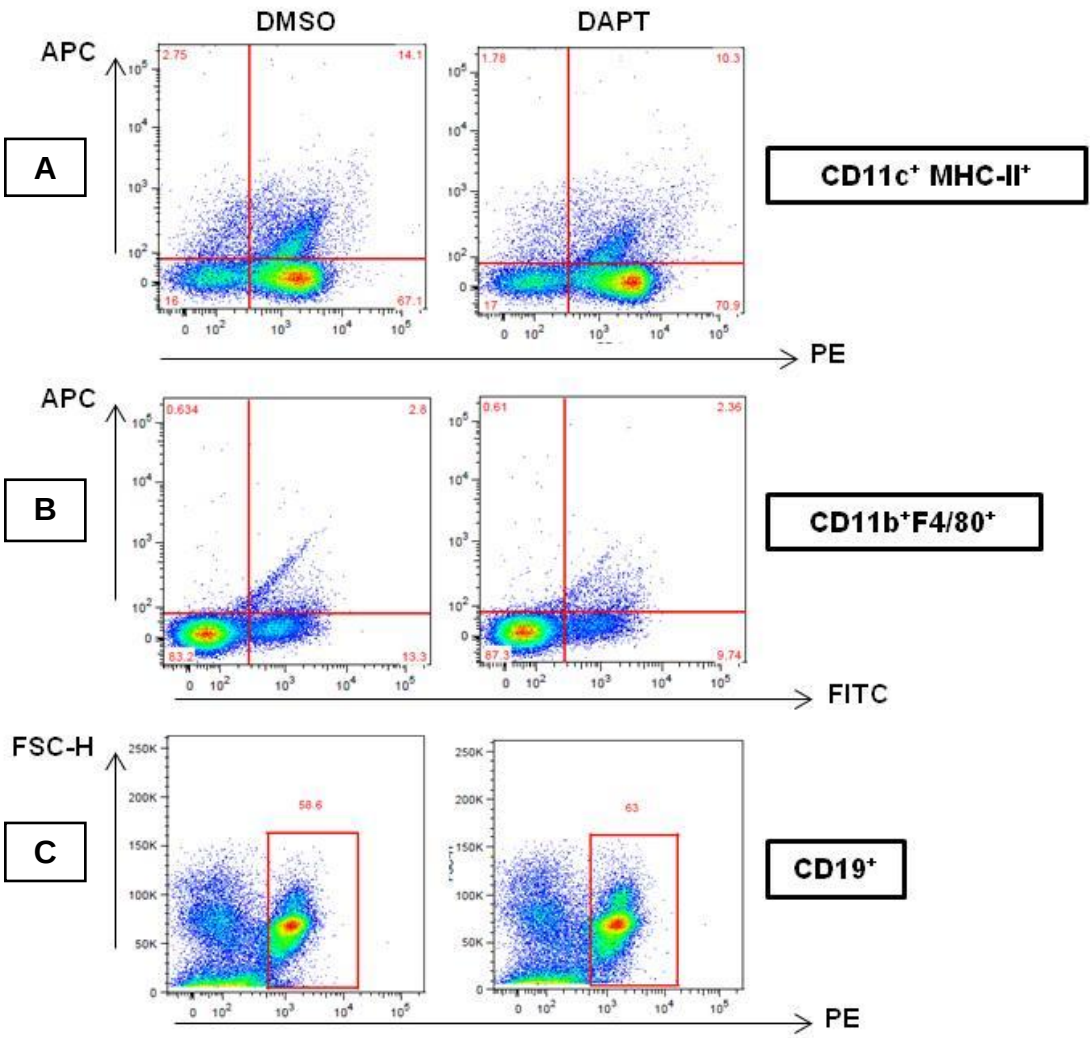

Figura 39. Perfil das células dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Camundongos BALB/c NUDE foram tratados com DAPT e/ou veículo (DMSO) e infectados intratraquealmente com 10^6 leveduras do Pb18 ou PBS por 45 dias. Decorrido o tempo de infecção, as células totais dos pulmões foram obtidas e ajustadas na concentração de $5x10^5$ para a realização da marcação com **(A) anti-CD11c (APC), anti-MHC-II (PE), (B) anti-CD11b (FITC) F4/80 (APC), (C) anti-CD19 (PE).** O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACS CANTO), analisado pelo software FlowJo. Foram obtidos 50.000 eventos. Os dados são representativos de um experimento.

4.5.4 Perfil de citocinas do pulmão dos camundongos BALB/c NUDE após 15 dias de tratamento e infecção com leveduras do Pb18 por 45 dias

Será que os camundongos BALB/c NUDE apresentam um perfil diferente de produção de citocinas nos pulmões, e será que o tratamento com DAPT interfere nesse perfil? Para responder essas perguntas, realizamos a dosagem das citocinas IL-6, TNF-α, IL-1β e IL-10.

Ao analisarmos a figura 40, podemos constatar que a infecção com Pb18, sem tratamento (DMSO) consegue induzir a produção de IL-6, TNF-α, IL-1b e IL-10. Os camundongos tratados antes da infecção (DAPT) possuem menor produção de TNF-α, IL-1β e IL-10.

Além disso, verificamos que o tratamento com DAPT nesses camundongos não foi capaz de diminuir a produção de IL-6, como já observamos nos camundongos BALB/c.

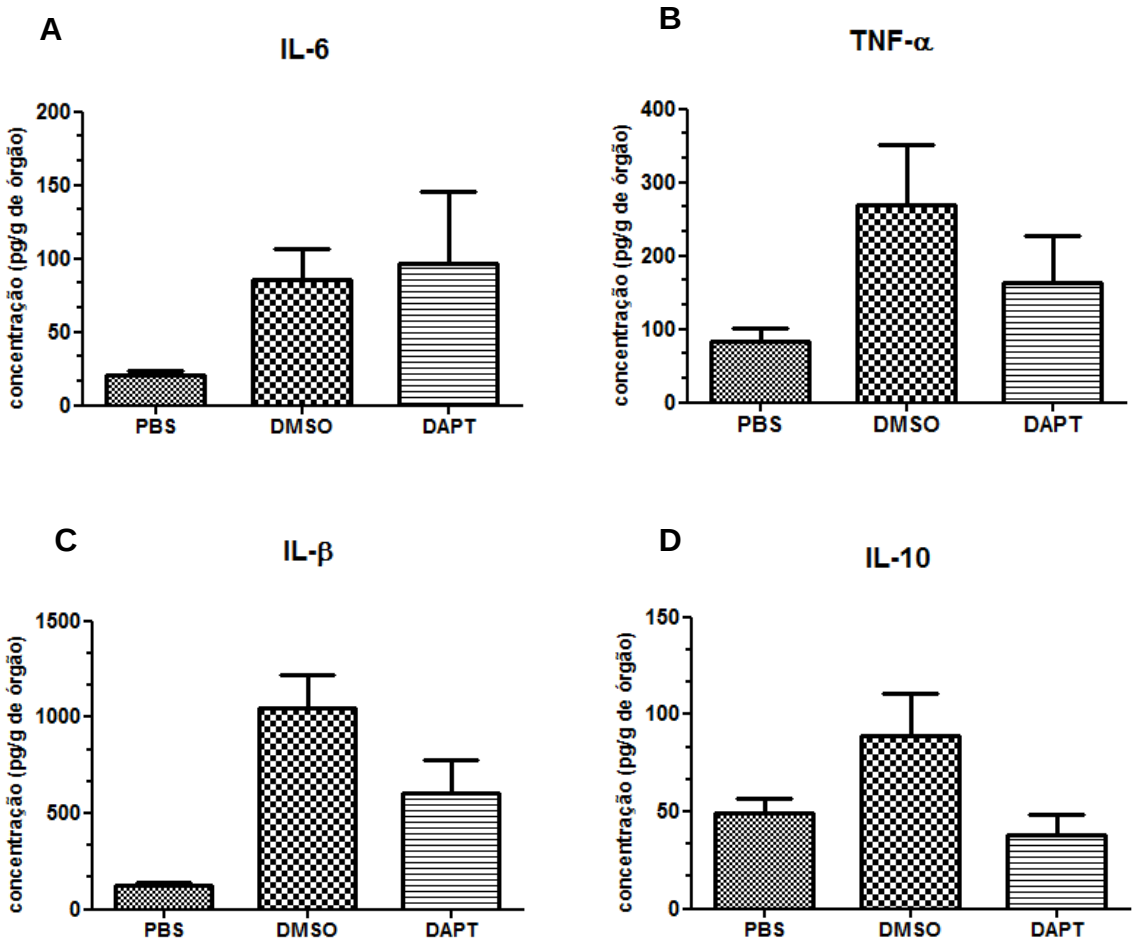

Figura 40. Perfil de produção de citocinas dos pulmões de camundongos BALB/c NUDE tratados com DAPT por 15 dias e infectados por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Aplicação da técnica de ELISA de captura para mensuração dos níveis de citocinas no sobrenadante do pulmão. (**A) Perfil da produção de IL-6 nos pulmão dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção. (B) Perfil da produção de TNF-α nos pulmões dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção. (C) Perfil da produção de IL-1β nos pulmões dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção. (D) Perfil da produção de IL-10 nos pulmões dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias**. Resultado representativo de um experimento. Resultados expressos em mediana dos dados e analisados por teste t, unpaired t test com Welch's correction. (n=5)

4.5.5 Perfil de citocinas dos linfonodos após tratamento de 15 dias com DAPT e infecção com leveduras do Pb18 por 45 dias

A dosagem das citocinas dos linfonodos desses animais foram realizadas para melhor compreensão da complexidade da resposta imunológica na ausência de linfócitos T. Será que o tratamento com DAPT interfere na produção de citocinas? Será que apresenta um perfil diferente dos linfonodos dos camundongos BALB/c? Essas foram às perguntas que tentamos responder.

Na figura 41, verificamos que quase não há diferença na produção de citocinas dos linfonodos desses animais, entre os grupos tratados (DAPT) e não tratados (DMSO). Podemos constatar que há um pequeno aumento de IL-6 e TNF-α no grupo tratado (DAPT).

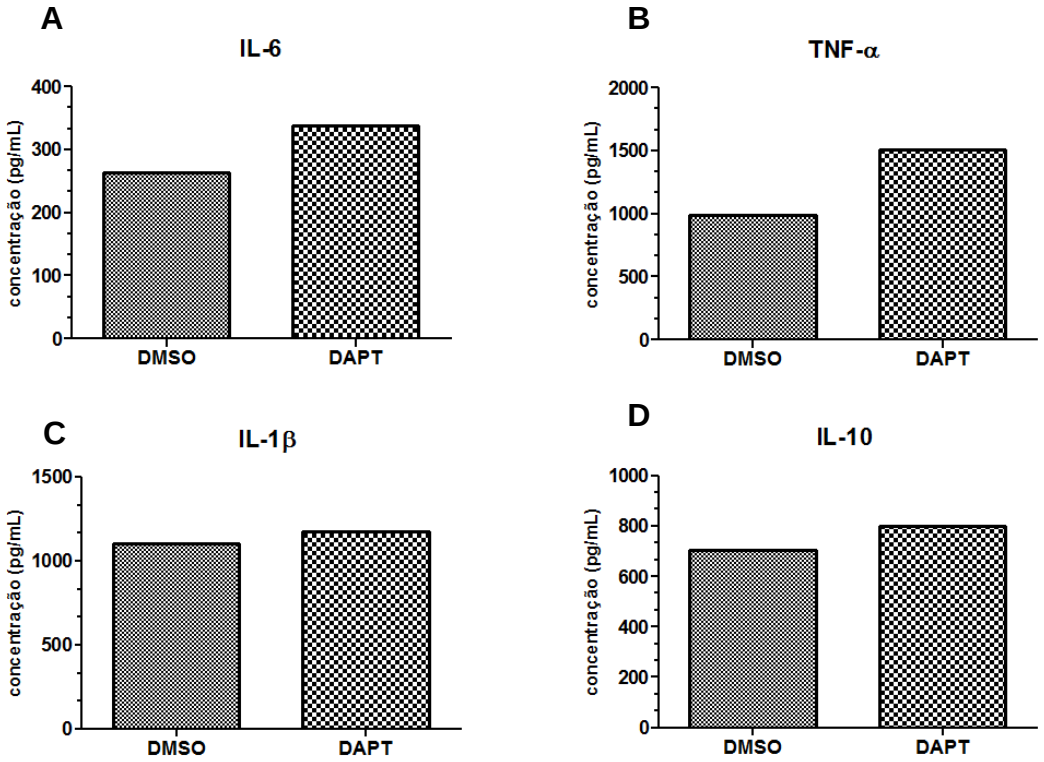

Figura 41. Perfil de produção de citocinas dos linfonofodos de camundongos BALB/c NUDE tratados com DAPT por 15 dias e infectados por 45 dias com leveduras do Pb18 (10^6). Aplicação da técnica de ELISA de captura para mensuração dos níveis de citocinas no sobrenadante do linfonodo. **(A) Perfil da produção de IL-6 nos linfonodos dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção. (B) Perfil da produção de TNF-α nos linfonodos dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção. (C) Perfil da produção de IL-1β nos linfonodos dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção. (D) Perfil da produção de IL-10 nos linfonodos dos camundongos tratados e não tratados com DAPT após 45 dias de infecção.** Resultado representativo de um experimento. Resultados expressos em mediana dos dados e analisados pelo teste de Kruskall-Wallis, múltiplas comparações por Dunns.

5. Discussão

Macrófagos são células importantes na resposta imune inata e adaptativa contra patógenos. O reconhecimento de micro-organismos via receptores TLR em macrófagos induz aumento das atividades fagocíticas e citotóxicas, além da produção de citocinas inflamatórias envolvidas na regulação da diferenciação de células T. Além disso, macrófagos apresentam plasticidade, capazes de alterar suas funções em respostas a estímulos ambientais, o que lhes confere a capacidade de se adaptarem a diferentes situações (GONZALEZ et al., 2015).

A resposta granulomatosa é um mecanismo complexo de defesa do hospedeiro em uma tentativa de conter a infecção e os agentes infecciosos numa única região, para impedir a disseminação do agente para outros órgãos. O balanço desse processo inflamatório é dependente da dinâmica de mediadores inflamatórios, células inflamatórias e células do tecido. A formação do granuloma é característica da PCM, e em modelo animal há a formação do granuloma do tipo Th1 em animais resistentes, com presença de IFN-γ, e do granuloma do tipo Th2 em animais suscetíveis, com presença de IL-4, IL-5 e IL-13. Estudos vêm demonstrando que a via de sinalização Notch e TLR participam do processo de formação dos granulomas, por meio da ativação de TLR 9 e do ligante Delta 4. Sabe-se também, que diferentes agonistas de TLR são capazes de modular a expressão dos receptores Notch e seus ligantes em células apresentadoras de antígenos, e influenciam a resposta imune do hospedeiro (PALAGA et al., 2008). Dessa forma, essas duas vias de sinalização parecem colaborar entre si durante o estabelecimento da imunidade frente aos agentes infecciosos.

Durante o processo infeccioso, regulação apropriada da produção de citocinas para o controle da inflamação e da infecção é importante, visto que uma resposta inapropriada pode promover sepse, inflamação crônica, doenças autoimunes e câncer. É nesse contexto que a sinalização Notch entra, pois está envolvida na resposta inflamatória de macrófagos, e sua supressão por inibidores farmacológicos demonstrou influência dessa via na secreção de mediadores inflamatórios, como TNF-α e IL-6. Dessa forma, nosso estudo verificou a influência que essa via de sinalização podia exercer na resposta imune de macrófagos contra o Pb18, se o fungo é capaz de modular a ativação dessa via e se existe uma inter-relação com a via de TLR, sendo esta ativada pelo LPS.

Primeiramente investigamos se o Pb18 era capaz de ativar o receptor Notch1 em macrófagos da linhagem J774. Em nível transcricional (figura 7) observamos que o Pb18 consegue ativar o receptor Notch1. E ao utilizar o inibidor farmacológico da via de Notch (DAPT), verificamos que há bloqueio da ativação desse receptor.

Sabe-se que o inibidor farmacológico da γ-secretase que utilizamos em nossos ensaios tanto *in vivo* quanto *in vitro*, reprime a clivagem S3 do receptor Notch 1, impedindo a liberação e translocação do NICD (domínio intracelular do núcleo) o que inibe a ativação da sinalização (ARUMUGAN et al., 2006; GELING et al., 2002).

Observamos que na inibição da via de Notch em macrófagos J774, há diminuição da carga fúngica (figura 8). E esta diminuição fica mais acentuada quando há ativação da via de TLR 4 com LPS e depois bloqueio da ativação do receptor Notch1 (DAPT). Isso demonstra que os macrófagos J774 são mais eficientes em matar o Pb18 quando há ativação de TLR 4 juntamente com o bloqueio da ativação do receptor Notch1. Anteriormente, como foi descrita na minha dissertação, na ausência da ativação do receptor Notch1 os macrófagos J774 apresentaram capacidade fagoctítica maior, assim nossos resultados evidenciaram que os macrófagos fagocitam e matam o Pb18 mais eficientemente.

Entender o papel das citocinas na atividade de macrófagos contra o Pb18 é extremamente importante para elucidar os mecanismos de defesa da paracoccidioidomicose especialmente nos estágios iniciais da infecção, sendo IL-6 uma citocina extremamente importante no processo infeccioso e inflamatório. Como demonstrado por Siqueira e colaboradores (2009), a IL-6 parece contribuir com a patogênese da infecção pela cepa virulenta Pb18, ao promover o crescimento do fungo nos estágios iniciais de fagocitose. Esse efeito de desativação da IL-6 em macrófagos com consequente aumento do crescimento do fungo já foi descrito em outros estudos com microrganismos intracelulares que são capazes de induzir a síntese de IL-6 por células fagocíticas. Dessa forma, nossos resultados evidenciaram que o fungo tem a capacidade de promover a produção de IL-6 via TLR 4-Notch1, fazendo-nos supor que essa citocina seja importante para o estabelecimento da doença ao ser benéfica para o fungo e prejudicar o hospedeiro.

De acordo com Bermudez e colaboradores (1992) e Siqueira e colaboradores (2009), o aumento da produção de IL-6 é dependente da regulação negativa de TNF-α em macrófagos. A produção inicial de IL-6 pode inibir eficientemente a produção de TNF-α e consequentemente prejudicar a atividade fungicida de monócitos contra a cepa virulenta do Pb18. Nossos dados demonstram que concomitante ao aumento da produção de IL-6, quando macrófagos J774 são estimulados com LPS existe diminuição da produção de TNF-α, corroborando com esses estudos anteriormente realizados.

Palaga e Wongchana (2011) demonstraram que o RBP-J (CSL) é capaz de ligar-se ao DNA na região promotora de IL-6 regulando diretamente a produção de IL-6 impedindo que o NF-κB tenha acesso a esse promotor. Assim, a ativação de Notch 1 (observável pelo

aumento de transcrição do receptor Notch 1) é capaz de ativar o RBP-J e induzir à produção de IL-6; porém, essa produção somente passa a ser relevante, quando temos coestímulo da via de TLR 4 (por meio do LPS).

A análise da morte celular dos macrófagos demonstrou que o fungo não é citotóxico para essas células (figura 11). Esse resultado corrobora com os resultados de fagocitose já demonstrados nos nossos outros estudos, ao revelar que os macrófagos são capazes de fagocitar o fungo e continuam viáveis.

A inter-relação entre Notch e TLR já vem sendo estudada. Tsao e colaboradores (2011) demonstraram que o LPS é capaz de induzir uma resposta inflamatória e que essa resposta é atenuada na presença do inibidor γ-secretase. Hu e colaboradores (2008) verificaram que a estimulação de LPS induz a expressão dos genes alvo da via de Notch *hes 1* e *hey 1*, sem aumentar a expressão de NICD em macrófagos. Zhang e colaboradores (2012) demonstraram que a interação entre TLR e Notch é complexa, e assim como outro processo fisiológico, é necessário um balanço entre as duas vias. Nesse trabalho foi possível verificar que a ativação de TLR 4/9 induz a expressão de Notch 1/2 em macrófagos, e que a ativação de Notch suprime a produção de citocinas inflamatórias produzidas por TLR, ao mesmo tempo em que ocorre um feedback na ativação dos genes alvo de Notch. Dessa forma, percebe-se que a colaboração entre as duas vias de sinalização é complexa e depende do modo como ambas são ativadas.

Observamos em macrófagos J774 que existe ativação da via de Notch, com produção de IL-6, e ao bloquearmos o receptor Notch 1 há diminuição de IL-6, aumento de TNF-α, e diminuição da carga fúngica. Com isso, decidimos verificar se esses resultados seriam reproduzíveis em outro tipo de macrófago. Utilizamos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Com essas células realizamos os mesmo ensaios e verificamos que na presença da ativação da via de TLR 4 com LPS concomitante a inibição do receptor Notch 1, há diminuição dos níveis de IL-6, principalmente após 12h de interação com leveduras do Pb18. Já a dosagem de TNF-α evidenciou aumento dessa citocina em 12h de interação nos BMDMs com DAPT e com LPS/DAPT. Perfil de citocinas similares ao observado com os macrófagos J774.

A carga fúngica (figura 12) desses BMDMs também apresentou perfil similar aos macrófagos J774. Principalmente após 12h de interação na presença do DAPT e de DAPT/LPS há diminuição da carga fúngica. Entretanto, o índice de fagocitose (figura 13) apresentou resultado diferente do observado com os macrófagos J774. Na presença do DAPT, principalmente em 12h e 24 horas de interação, há diminuição do índice de fagocitose. Dessa forma, observamos que o bloqueio do receptor Notch 1 e ativação de TLR

4 nos BMDMs fagocitam menos, mas matam mais eficiente o fungo, visto que a carga fúngica diminui.

Múltiplos mecanismos estão envolvidos no controle da ativação de macrófagos, e a via de sinalização Notch é incluída neste contexto. Diversos estudos vêm demonstrando a correlação entre as vias de sinalização Notch e TLR em macrófagos (FOLDI et al., 2010; PALAGA et al., 2008). A ativação de TLR é capaz de regular a expressão dos ligantes de Notch e o RBP-J, favorecendo a sinalização Notch. Para melhor caracterizarmos a interdependência entre as vias de TLR e Notch em macrófagos, realizamos ensaios com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos knouckout para o receptor TLR 4, na presença/ausência do DAPT (inibidor da γ-secretase). No entanto, verificamos que na ausência do receptor TLR 4, há aumento da fagocitose (figura 18). Ao inibirmos a via de Notch com DAPT, o índice da fagocitose dos BMDMs TLR $4^{-/-}$ se mantém maior que do WT, mas diminui quando comparado com as BMDMs TLR $4^{-/-}$ sem DAPT. Isso nos leva a entender que o processo de fagocitose não é dependente do receptor TLR 4, mas sim da interação Nocth1-TLR 4, visto que na ausência de ambos o índice de fagocitose diminui.

Os BMDMs de TLR $4^{-/-}$ com DAPT fagocitam menos, mas matam mais eficientemente o Pb18 observado com a diminuição da carga fúngica (figura 17), indicando que a ativação do receptor Notch1 interfere na capacidade dos macrófagos em matar o Pb18. Sua ausência melhora a capacidade microbicida dos macrófagos, e isso independe de TLR 4.

Ainda com os BMDMs de TLR $4^{-/-}$, verificamos a produção de IL-6 (citocina extremamente importante na PCM e na via de Notch). Esses macrófagos produzem menos IL-6, quando comparamos com o WT (C57BL/6), e na presença do DAPT não há diferença significativa. Os macrófagos derivados de camundongos C57BL/6 apresentam um comportamento diferente do que observamos com os macrófagos de medula de BALB/c, por isso um resultado diferente do que observamos anteriormente.

Estudos experimentais demonstraram que leveduras de Pb18 são reconhecidas por receptores do tipo Toll em macrófagos, resultando no aumento da capacidade fagocitica e na produção de NO, mas sem diminuir a carga fúngica (CALICH et al., 2008). Assim, o reconhecimento do fungo via TLR 2 e TLR 4 pode representar um mecanismo de escape que permite a replicação do fungo no interior de fagócitos.

Zeng e colaboradores (2012) demonstraram a existência de um cross-talk entre TLR 4 e Notch 1 e isso acarreta no aumento do processo inflamatório ao modular a ativação de NF-κB. Nossos resultados colaboram com esse estudo, visto que quando há ativação de

TLR 4 e de Notch 1 existe o favorecimento do processo inflamatório e consequente desenvolvimento da doença.

Durante um processo infeccioso é necessária uma regulação apropriada da produção de citocinas para o controle da infecção e da inflamação, visto que uma resposta inapropriada pode promover sepse, inflamação crônica, doenças autoimunes e até câncer. A sinalização Notch encontra-se nesse contexto, visto que este receptor está envolvido na resposta inflamatória de macrófagos, e sua inibição por inibidores farmacológicos influencia na secreção de mediadores inflamatórios.

Os nossos resultados com os ensaios *in vitro* demonstraram que: (1) Quando há ativação de TLR 4 (LPS) e ativação do receptor Notch1 nos macrófagos existe aumento da produção de IL-6, corroborando com os dados de Hu e colaboradores (2008). (2) Quando existe a inibição de Notch, mesmo com ativação de TLR 4 ocorre diminuição da produção de IL-6, sendo justificada pelo fato de a ausência de Notch não promover a ativação de RBP-J, culminando com a supressão de IL-6, porém, essa diminuição de IL-6 é balanceada pela ativação de TLR 4 por meio do LPS. Dessa forma, podemos supor que existe a necessidade de ativação de ambas as vias para que exista a produção de IL-6. Isso pode ser verificado também com macrófagos derivados de medula óssea. E com a inibição de Notch1, os macrófagos conseguem fagocitar mais eficiente, com diminuição da carga fúngica.

Com esses resultados, surgiu a pergunta: se a inibição da ativação do receptor Notch1 em macrófagos favorece a morte do fungo, será que tem alguma interferência na infecção *in vivo*? Será que o bloqueio da sinalização Notch é capaz de promover a redução da carga fúngica? Para responder essas perguntas, decidimos realizar um protocolo de tratamento com DAPT nos camundongos BALB/c antes de realizarmos a infecção. Os animais foram tratados com o inibidor da via de Notch de acordo com protocolo baseado nos trabalhos de Jin e colaboradores (2011) e McGowan e colaboradores (2011) (descrito em material e métodos) e depois infectados com leveduras do Pb18. Realizamos infecção de 24 horas, 20 dias e 45 dias.

Como é possível observar na figura 22, existe diminuição da carga fúngica nos pulmões dos camundongos com o tratamento. Após 24 horas de infecção percebemos uma tendência na diminuição da carga fúngica; com 20 dias de infecção ambos os grupos apresentam carga fúngica similar, mas com 45 dias de infecção os camundongos tratados com DAPT apresentam menor carga fúngica quando comparados com os camundongos não tratados. Isso evidencia que a ativação da sinalização Notch favorece o desenvolvimento da doença.

Em relação ao perfil de células dos pulmões dos camundongos, após 20 dias de infecção, percebemos principalmente aumento de células $CD11b^+$, indicativo de que com o

tratamento há aumento provavelmente de macrófagos. Nos linfonodos verificamos que com o tratamento há um discreto aumento de ambas as células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Após 45 dias de infecção, constatamos ainda no grupo tratado aumento de células $CD11b^+F4/80^+$, ou seja, maior quantidade de macrófagos nos pulmões e menor células Ly6c - $Ly6G^+$.

O perfil de citocinas nos pulmões (figura 29) também apresenta diferenças entre o grupo tratado (DAPT) e não tratado (DMSO). Verificamos que com o tratamento, há diminuição de IL-6 (o que já era esperado, visto que Notch1 controla diretamente a produção de IL-6), diminuição de IL-17 e de IL-1β, principalmente após 20 dias de infecção. Essa diminuição da produção de citocinas é um indício da modulação da resposta imunológica, para controlar o processo inflamatório, pois uma inflamação rigorosa também prejudica o hospedeiro.

Tavares e colaboradores (2013) demonstraram que a sinalização via IL-1β tem um papel importante na morte do Pb18 por macrófagos murinos. Na cinética de infecção, verificamos que há produção de IL-1β após 24 horas de infecção, diminui com 20 dias e volta a aumentar com 45 dias, no grupo tratado com DAPT. Essa queda de IL-1β em 20 dias explica porque a carga fúngica nesse tempo se manteve parecida nos dois grupos.

Em 2009, Ito e colaboradores evidenciaram num modelo murino a conexão entre a sinalização Notch e granulomas inflamatórios. Micobactérias induzem a expressão do ligante Delta 4 via TLR 9 , levando a produção de IL-17 e a formação do granuloma. Além disso, IL-17 induz o recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção, para tentar controlar a infecção. Entretanto, foi demonstrado que a produção de IL-17 promove inflamação e suscetibilidade à infecção por *C. albicans* e *A. fumigatus* (ZELANTE et al., 2007; LOURES et al., 2009). Em 2009, Mukherjee e colaboradores demonstraram que a produção de IL-17 é dependente diretamente da ativação da via de Notch e também de IL-6, assim na ausência dos sinais de Notch e na ausência de IL-6 há diminuição dessa citocina. Nossos resultados evidenciaram que nos pulmões após 20 dias de infecção, há grande diminuição de IL-17 no grupo tratado com DAPT, corroborando com os estudos anteriores. E essa diminuição de IL-17 também favorece o controle da infecção, como visto em outros modelos de infecções fúngicas.

As citocinas IL-10 e IFN–γ ficaram abaixo do limiar de detecção durante a infecção.

A sinalização Notch inicialmente tinha sido descrita como uma chave importante na determinação da linhagem celular. Entretanto, sabe-se que ela participa também do desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T, bem como no desenvolvimento de células T "helper" na periferia, e geração de células T regulatórias (OSBORNE & MINTER, 2007; MAEKAWA et al., 2003).

A caracterização da resposta imune humoral (figura 30) também foi verificada, com dosagem de IgG total e dos seus isotipos. Nossos resultados evidenciaram que com o tratamento, há aumento dos níveis de IgG total no soro dos camundongos, principalmente após 45 dias de infecção. E ao caracterizarmos o isotipo, há aumento de ambos os isotipos (IgG1 e IgG2a) nos soros dos camundongos tratados. Isso indica que a partir do 20º dia de infecção até 45º já ocorre modulação da resposta imune humoral, controlando o processo infeccioso.

Ainda em relação ao tratamento *in vivo*, verificamos se a inibição da sinalização Notch era capaz de interferir na capacidade proliferativa dos linfócitos. Assim, o ensaio de linfoproliferação foi realizado (figura 33). Nós observamos que a inibição de Notch não prejudica a capacidade proliferativa dos linfócitos, pois houve proliferação na presença de phitohemaglutinina. Entretanto, na presença do estímulo específico (CFA) houve proliferação, e foi similar em ambos os grupos tratado (DAPT) e não tratado (DMSO). Observamos também que houve maior proliferação de células T $CD8^+$. Utilizando o sobrenadante da cultura da linfoproliferação, verificamos a produção de IFN-γ. Contudo, o CFA não induziu a produção dessa citocina.

Com esses resultados promissores do tratamento *in vivo* dos camundongos, optamos por verificar se o controle da carga fúngica que observamos era dependente ou independente das células T. Para isso, camundongos BALB/c NUDE foram utilizados, pois estes possuem o timo atrofiado e por consequência ausência de linfócitos T.

Nesses animais, observamos que a carga fúngica (figura 35) dos pulmões mantém-se similares em ambos os grupos tratado (DAPT) e não tratado (DMSO). Dessa forma, o controle da infecção é dependente das células T. Mais ainda, verificamos que não há diferença entre o perfil celular dos pulmões dos camundongos com tratamento (figura 36), há apenas aumento de células $CD19^+$. Talvez como forma de compensar a falta de células T. Nos linfonodos, o perfil celular é similar nos dois grupos.

Em relação ao perfil de citocinas nos pulmões, observamos diminuição de TNF-α, de IL-1β e de IL-10 nos camundongos tratados com DAPT. Citocinas nos linfonodos foram similares em ambos os grupos. Essa diminuição de IL-1β explica porque não houve controle da carga fúngica, visto que a falta dessa citocina dificulta o processo de morte do Pb18 pelos macrófagos (TAVARES et al., 2013).

Estudos envolvendo PCM e camundongos BALB/c NUDE mostram que a ausência de linfócitos T induz uma infecção e doença mais grave nesses animais, com aumento da carga fúngica e formação de extensos granulomas indicando a importância dessas células no controle da doença. A ausência da ativação de Notch 1 nesses animais, não conseguiu

melhorar o prognóstico da doença, pois não controlou a carga fúngica dos pulmões. Evidenciando que a diminuição da carga fúngica observada nos camundongos BALB/c com o tratamento com DAPT é dependente dessas células.

Nossos resultados nos leva a sugerir que o fungo Pb18 utiliza a sinalização Notch1-TLR 4 em macrófagos como um mecanismo de escape do Pb18.

6. Conclusão

- **Macrófagos J774**
  - ✓ O fungo Pb18 consegue ativar a via de sinalização Notch, ao ativar o receptor Notch1;
  - ✓ Bloqueio da sinalização Notch com DAPT e concomitante ativação de TLR 4 promove menor carga fúngica, com diminuição da produção de IL-6 e aumento de TNF-α;
- **Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c**
  - ✓ Bloqueio da sinalização Notch com DAPT diminui a carga fúngica e fagocitose. Os macrófagos fagocitam menos, mas são mais eficientes em matar o Pb18;
  - ✓ Bloqueio da sinalização Notch com DAPT e concomitante ativação de TLR 4 diminui a carga fúngica e fagocitose;
  - ✓ Bloqueio da sinalização Notch com DAPT e concomitante ativação de TLR 4 há menor produção de IL-6, com aumento de TNF-α;
- **Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos TLR $4^{-/-}$**
  - ✓ Ausência do receptor TLR 4 e bloqueio da sinalização Notch diminui a carga fúngica e diminui a fagocitose. Entretanto, apenas ausência do receptor TLR 4 aumenta a fagocitose. O processo de fagocitose é dependente da relação entre ambos os receptores (Notch e TLR 4);
  - ✓ Ausência da produção de IL-6 com esses BMDMs;
- **Tratamento *in vivo* com DAPT em camundongos BALB/c**
  - ✓ Diminui a carga fúngica dos pulmões;
  - ✓ Diminui produção de IL-6 nos pulmões, marcador de bloqueio da sinalização Notch;
  - ✓ Diminuiu IL-17, citocina também dependente da ativação de Notch;
  - ✓ Aumento de células $CD11b^{+}$ nos pulmões;
  - ✓ Aumento dos níveis de IgG total e isotipos, indicando modulação da resposta imune humoral após 20 dias e 45 dias de infecção;
  - ✓ Bloqueio da sinalização Notch não interfere na proliferação de linfócitos;
- **Tratamento *in vivo* com DAPT em camundongos BALB/c NUDE**
  - ✓ Carga fúngica similar entre os grupos tratados (DAPT) e não tratados (DMSO);
  - ✓ A diminuição da carga fúngica é dependente das células T;

- ✓ Perfil de células pulmonares similares entre os grupos tratados (DAPT) e não tratados (DMSO);
- ✓ Diminuição de TNF-α, IL-1β e IL-10 nos pulmões.

Podemos concluir que o fungo Pb18 consegue ativar o receptor Notch1 na célula ao mesmo tempo ocorre ativação de TLR 4. Essas ativações induzem a produção de IL-6 por macrófagos. Isso diminui a capacidade dos macrófagos em matar o fungo, além de permitir o crescimento do fungo no seu interior, agravando o quadro de infecção e desenvolvendo a doença.

Com o bloqueio da sinalização Notch, há diminuição da produção de IL-6 e IL-17, aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos e passam a ser mais microbicidas, diminuindo a carga fúngica. Sendo que essa diminuição da carga fúngica é dependente das células T. Com isso leva a um prognóstico de cura.

Em resumo, nossos resultados sugerem que o fungo Pb18 utiliza a via de sinalização Notch-TLR 4 como um mecanismo de escape na PCM (figura 43).

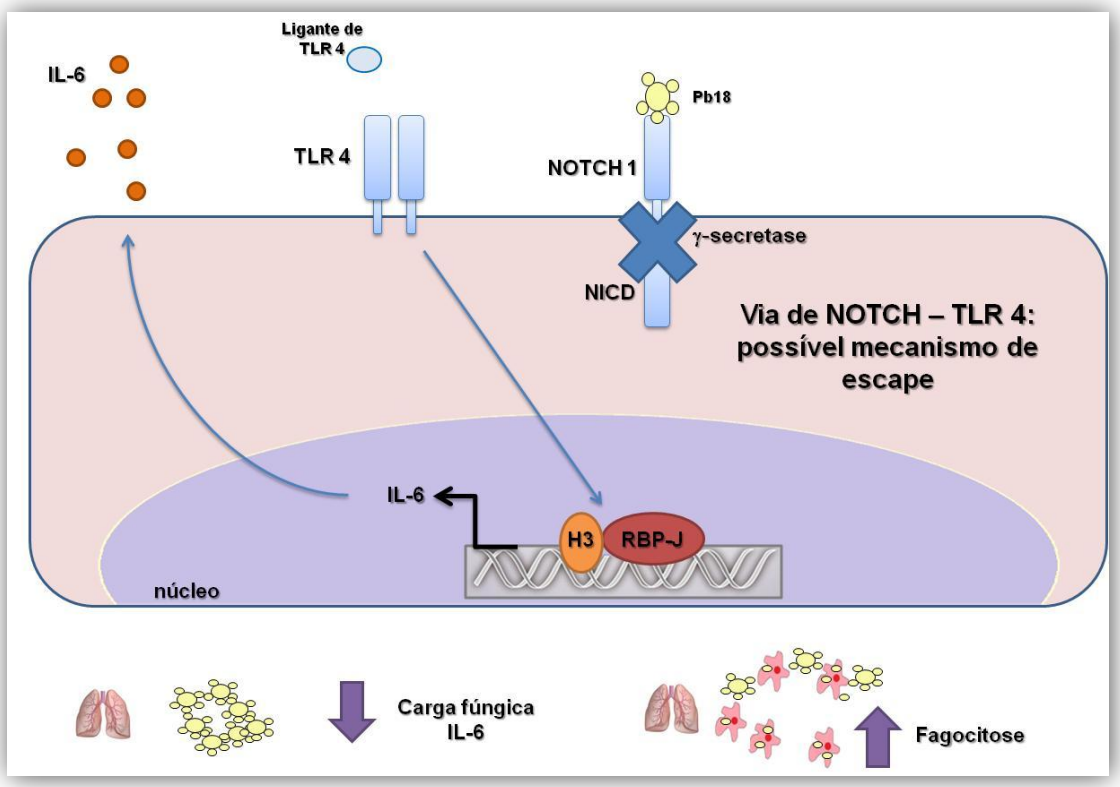

Figura 42. Notch-TLR 4 como possível mecanismo de escape do Pb18 em macrófagos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, F. **Estudos comparativos do granuloma coccidiódico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro.** An. Fac. Med. S. Paulo. v. 5, p.135-41, 1930.

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.

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

ARUMUGAN, T.V.; CHAN, S.L.; Jo, D.G.; YILMAZ, G.; TANG, S.C.; CHENG, A.; GLEICHMANN, M.; OKUN,E.; DIXIT, V.D.; CHIGURUPATI, S.; MUGHAL, M.R.; OUYANG, X.; MIELE, L.; MAGNUS, T.; POOSALA, S., GRANGER, D.N., MATTSON, M.P. **Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemia stroke.** Nat. Med. 12:621-623, 2006.

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

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

BERBERT, A.L.C.V.; FARIA, G.G.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; SILVA, M.M.M.D.; MINEO, J.R.; LOYOLA, A.M. **Histological and serological evidence of experimental paracoccidioidomycosis in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae).** Int. J. Exp. Path. 88, 55-62, 2007.

BERNARD, G.; FRANCO, M. Paracoccidioidomicosys. In: MERZ, W.G., HAY, R.J. **Medical Micology.** Topley's and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. 10 ed. Hodder Arnold. p.541-59, 2001.

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

BITTENCOURT, J.I.M.; de OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. **Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 21(6):1856-1864, 2005.

BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAIODARNOU, P.M.O.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. **Endemic regions of paracoccidioidomicosys in Brasil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region.** Am. J. Trop Med. Hyg. v.61, p. 390-394, 1999.

BOCCA, A.L.; AMARAL, A.D.; TEIXEIRA, M.M.; SATO, P.K.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; FELIPE, M.S.S. **Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues.** Future Microbiol. 8(9), 1177-1191, 2013.

BORELLI, D. **Significance of dimorphism of various parasitic fungi.** Mycopathol. Mycol. Appl. v.46 (3), p.237-9. 1972.

BORGREFFE, T.; OSWALD, F. **The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes.** Cell Mol. Life Sci.v. 66, p.1631-1646, 2009.

BORGES-WALMSLEY, M.I.B.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. **The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*.** TRENDS in Microbiology. v.10. 2002.

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

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

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

BROWN, G.D. **Innate antifungal immunity: the key role of phagocitosys.** Annu. Rev. Immunol., 29:1-21, 2011.

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

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

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. **Paracoccidioidomycosis: an update.** Clinical Microbiol. Reviews. Vol.6. n2. 89-117, 1993.

BUENO, R.A.; THOMAZ, L.; MUÑOZ, J.E.; da SILVA, C.J.; NOSANCHUK, J.D.; PINTO, M.R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. **Antibodies against glycolipids enhance antifungal activity of macrophages and reduce fungal burden after infection with *Paracoccidioides brasiliensis*.** Front. Microbiol. 7:74, 2016.

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

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.

CALICH, V.L.G.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T.A.; LOURES, C.V. **Toll-like receptors and fungal interactions: the role of TLR 2, TLR 4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis.** Immunol. Med. Microbiol. 53(1-7), 2008.

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.

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

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

CANO, L.E.; GONZALEZ, A.; LOPERA, D.; NARANJO, T.W.; RESTREPO, A. **Pulmonary Paracoccidioidomycosis: clinical, immunological and histopathological aspects.** Lung Diseases- Selected State of the Art Reviews. 2012.

CAMBI, A.; NETEA, M.G.; MORA-MONTES, H.M.; GOW, N.A.; HATO, S.V.; et al. **Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on *N*-linked mannan**. *J.* Biol. Chem. 283:20590–99, 2008.

CAMPOS, M.R.M.; RUSSO, M.; GOMES, E.; ALMEIDA, S.R. **Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrun*.** Microbes and Infection. 372-379. 2006.

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

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

COUTINHO, Z.F.; 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.

Da SILVA, C.E.A.P.; CORDEIRO, A.F.; GOLLNER, A.M.; CUPOLILO, S.M.N.; QUESADO-FILGUEIRAS, M.; CURZIO, M.F. **Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central: relato de caso.** Arq. Neuropsiquiatr. 58(3-A): 741-747, 2000.

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

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.

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

FAVA, S.D.C.; FAVA NETTO, C. **Epidemiology surveys of histoplasmin and paracoccidioidina sensitivity in Brazil.** Rev. Instituto Med. Tropical de São Paulo. v.40. n.3, 1998.

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

FRANCO, M.; LACAZ, C.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomicosys.** CRC Press. Boca Ratón. p.409, 1994.

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

FRANTZ, S; ERTL., G.; BAUERSACHS, J. **Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease.** Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. v. 4, n. 8, p. 444-54, Aug 2007.

FELS, A.O.; COHN, Z.A. **The alveolar macrophage.** Journal of Applied Physiology. v.60. n.2. 353-369, 1986.

FIOR, R.; HENRIQUE, D. **Notch off: a perspective on the termination of Notch signaling.** Int. J. Dev. Bio. v.53, p. 1379-1384, 2009 **.**

FISCHER, A.; GESSLER, M. **Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors**. Nucleic Acids Res. v.35 (14), p. 4583-96, 2007.

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

FONSECA, E.R.S.; PARDAL, P.P.O.; SEVERO, L.C. **Paracocciodioidomicose em crianças em Belém do Pará.** Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop. v.32, p. 31-33, 1999.

FORTES, M.R.P.; KUROKAWA, C.S.; MARQUES, S.A.; MIOT, H.A.; MARQUES, M.E.A. **Immunology of Paracoccidioidomycosis,** Na. Bras. Dermatol. 86(3):516-25, 2011.

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

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. **Macrophages and inflammation**. Curr. Targets Inflamm. Allergy. v. 4 (3), p. 281-6, 2005.

FURTADO, J.S.; de BRITO, T.; FREYMULLER, E. **The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue.** Sabouraudia. 5(3):226-9, 1967.

GAY, N.J.; KEITH, F.J. **Drosophila Toll and IL-1 receptor.** Nature. 30;351(6325):355-6. 1991.

GEISSMAN, F.; GORDON, S.; HUME, D.A.; MOWAT, A.; RANDOLPH, G. **Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity.** Nature Immunology. v.10. 2010.

GELING, A.; STEINER, H.; WILLEN M.; BALLY-CUIF, L.; HAASS, C. **A g-secretase inhibitor blocks Notch signaling *in vivo* and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish.** EMBO reports. v.3, n.7, 688-694, 2002.

GREER, D.L.; RESTREPO, E. **La epidemiologia de la paracoccidioidomycosis.** Bol. Ofic. Sanit. Panamer. v.82, p.428-443, 1977.

GOH, F.; IRVINE, K.M.; LOVELACE, E.; DONNELLY, S.; JONES, M.K.; BRION, K.; HUME, D.A.; KOTZE, A.C.; DALTON, J.P.; INGHAM, A.; SWEET, M.J. **Selective induction of the Notch ligand Jagged-1 in macrophages by soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* involves ERK signalling.** Immunology. 127:326–337, 2009.

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

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

GONZALEZ, M.J.; RUIZ-GARCIA, A.; MONSALVE, E.M.; SANCHEZ-PIETRO, R.; LABORDA, J.; DIAZ-GUERRA, M.J.M.; RUIZ-HIDALGO, M. **DLK1 is a novel inflammatory inhibitor wich interferes with NOTCH1 signaling in TLR-activates murine macrophages.** Eur. J. Immunol. 45:2615-2617, 2015.

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

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

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

HUSAIN, S.; WAGENER, M.M.; SINGH, N. ***Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome.** Emerg. Infect. Dis. 7, 375-381, 2001.

ITO, T.; SCHALLER, M.; HOGABOAM, C.M.; STANDIFORD, T.J.; SANDOR, M.; LUKACS, N.W.; CHENSUE, S.W.; KUNKEL, S.L. **TLR9 regulates the mycobateria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4.** The Journal of Clinical Investigation. 119(1):33-46, 2009.

JIN, G.; ZHANF, F.; CHAN. K.M.; WONG, H.L.X.; LIU, B.; CHEAH, K.S.E.; LIU, X.; MAUCH, C.; LIU, D.; ZHOU, Z. **MTP1-MMP cleaves Cll1 to negatively regulate Notch signaling to maintain normal B-cell development.** The EMBO Journal. 30, 2281-2293, 2011.

KAISHO, T.; AKIRA, S. **Toll-like receptors as adjuvant receptors.** Biochem Biophys. Acta. 13;1589(1):1-13. 2002.

KALIS, C.; KANZLER, B.; LEMBO, A.; POLTORAK, A.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.A. **Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS suscetibility in mice.** Eur. J. Immunol. 33(3):798-805. 2003.

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.

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

KASHINO, S.S.; FAZIOLLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, I.C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. R**esistance 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 Res. v. 20, p. 89–97, 2000.

KAWAI, T., AKIRA, S. **Pathogen recognition with Toll-like receptors.** *Curr*. Opin. Immunol [S.I.], v. 17, p. 338-44, 2005.

KIMBLE, J.; SIMPSON, P. **The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation.** Annu Rev. Cell Dev. Biol. v.13, p.133-361, 1997.

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

KOVALL, R.A. **More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes**. Oncogene. v.27 (38), p. 5099-109, 2008.

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

LACAZ, C.S. Paracoccidioidomicose. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**, 8ª ed., São Paulo, Sarvier, Cap 13, p. 248-297, 1991.

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

LAM, J.S.; HUANG, H.; LEVITZ, S.M. **Effect of differential N-linked and O –linked mannosylation on recognition of fungal antigens by dendritic cells.** Plos ONE. 2(10):e1009, 2007.

LAZERA, C.Z.S.D.; COUTINHO, Z.F.; da SILVA, D.; PETRI, V.; de OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. **Mortalidade por paracocciodioidomicose: Brasil 1980-1995.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA. Rio de Janeiro. Brasil. São Paulo: Sociedade Brasileira de micologia. 1998.

LIEW, F.Y.; XU, D.; BRINT, E.K.; O'NEILL, A.J. **Negative regulation of Toll-like receptor mediated immune responses.** Nature Immunol. v.5. 2005.

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.; CALICH, V.L.G. **TLR 2 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.; 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. v.78. n.3. 1078-1088, 2010.

LOURES, F.V.; PINA, A.; FELONATO, M.; FERIOTTI, C.; de ARAÚJO, E.F.; CALICH, V.L.G. **MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responsees to *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** Infection and Immunity. v.79.n.6. 2470-2480, 2011.

LONDERO, A.T.; RAMOS, T.C.D. **Paracoccidioidomicosys: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul.** J Pneumol. v.16, p.129-32, 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.

MAEKAWA, Y.; TSUKUMO, S.; CHIBA, S.; HIRAI, H.; HAYASHI, Y.; OKADA, H.; KISHIHARA, K., YASUMOTO, K. **Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells.** Immunity. v.19. 19, 540-550. 2003.

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

MANTOVANI, B.; RABINOVITCH, M.; NUSSENZWEIG, V. **Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG).** The Journal of Experimental Medicine. v.135. 1972.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. **Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes**. Trends in Immunology. v.23 (11), p. 549-55, 2002.

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

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. v.23, p.344-6, 2005.

MARIM, F.M.; SILVEIRA, T.N.; LIMA, D.S.Jr.; ZAMBONI, D.S. **A method for generation of boné marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells.** Plos ONE. 5(12):e15263. 2010.

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

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

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

MEDZHITOV, R**. Toll-like receptors and innate immunity**. Nat. Rev. Immunol. 1, 135-145. 2001.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. **Innate Immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.** Cell. v.91, 295-298, 1997.

MEDHITOV, R.; JANEWAY, C.A. **Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.** Science. v.296. 298-300. 2002.

METZER, Z**. Macrophages in periapical lesions**. Endodon. Dent. Traumatol**.** v.16, p. 1-8, 2000.

McEWEN, J.G.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, B.L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. **In searche of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Arch. Med. Res. 26(3):305-6, 1995.

McGOWAN, P.M.; SIMEDREA, C.; RIBOT, E.J.; FOSTER, P.J; PALMIEN, D.; STEEG, P.S.; ALLAN, A.L.; CHAMBERS, A.F. **Notch 1 Inhibition alters the CD44hi/CD24lo population and reduces the formation of brain metastases from breast cancer.** Molecular Cancer Research. 2011.

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

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.

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

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

MONSALVE, E.; RUIZ-GARCIA, A.; BALADRN, V.; RUIZ-HIDALGO, M.J.; SANCHEZ-SOLANA, B.; RIVERO, S.; GARCIA-RAMIREZ, J.J.; RUBIO, A.; DIAZ-GUERRA, M. J.M. **Notch 1 up-regulates LPS induced macrophage activation by increasing NF-□B activity**. Eur. J. Immuno. p. 2556-2570, 2009.

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

MUSATTI, C.C.; PERAÇOLI, M.T.S.; SOARES, A.M.V.C.; REZKALLAH-WASSO, M.T. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-

MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis.** Boca Raton: CRC Press. p.175-186. 1994.

MUKHERJEE, S.; SCHALLER, M.A.; NEUPANE, R.; KUNKEL, S.L.; LUKACS, W. **Regulation of T cell activation by Notch ligand, Dll4, promotes IL-17 production and Rorc activation.** J. Immunolo. 182:7381-7388. 2009.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. **Protective and pathogenic functions of macrophage subsets**. Nat. Rev. Immunol. 11, 723–737. 2011.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R.; VEER, C.V.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L.P.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. **Differential expression and regulation of tool-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.** J. Immunol. 164:5998-6004, 2000.

NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.L.; BARRET, T.V.; et al. **Paracoccidioidomicose em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v.26, p. 19-27, 1986.

NEVES, J. Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias In: PATRUS, O.A.; COSTA, P.U.; NEVES, J. **Blastomicose sul-americana (Paracoccidioidomicose).** v.68, p.825-835, 1983.

NETEA, M.G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; VAN KRICKEN, J.H.; HORTUNG, T.; ADEMA, G.; KULLBERG, B.J. **Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of SL-10 and regulatory T cells.** J. Immunol. 172, 3712-3718. 2004.

NETEA, M.G.; WIJMENGA, C.; O'NEILL, L.A.J. **Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility.** Nature Immunology. v.13. n.6. 2012.

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

O'NEILL, L.A.; BOWIE, A.G. **The family of five: TIR domain containing adaptors in Toll-like receptor signaling.** Nat. Rev. Immunol. 7(5):353-64. 2007.

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

O'NEILL, L.A.J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A.G. **The history of Toll-like receptors- redefining innate immunity.** Nature Immunology. v.13. 2013.

OSBORNE, B.A.; MINTER, L. **Notch signaling during peripheral T cell activation and differentiation.** Nature Reviews. v.7. 2007.

OUTTZ, H.H.; WU, J.K.; WANG, X.; KITAJESKI, J. **Notch 1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates endothelial growth factor receptor 1 and inflammatory cytokine expression in macrophages**. J. Immunol. v.185 (7), p. 4363-73, 2010.

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

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

PARK, S.J.; MEHRAD, B. **Innate Immunity to *Aspergillus* species.** Clin. Microbiol. Rev. 22, 535-551. 2009.

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.

POWDERLY, W.G. **Cryptococcal meningitis and AIDS.** Clin. Infect. Dis. 17, 837-842. 1993.

PRADO, M.F.; SILVA, M.B.; LAURENTI. R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. **Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104: 513-521. 2009.

RESTREPO, A. **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved.** J. Med. Vet Mycol. v.23. p.323-334. 1985.

RESTREPO, A.; JIMENEZ, B.E. **Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast pahse in a chemically defined culture medium**. J. Clin. Microbiol. v.12, p.279-281, 1980.

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

RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. **The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?** Med. Mycol. v.39, p. 233-41, 2001.

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.

ROBINSON, M.J.; OSORIO, F.; ROSAS, M.; FREITAS, R.P.; SCHWEIGHOFFER, E.; GROSS, O.; VERBEEK, J.S.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G.D.; MOITA, L.F.; TAYLOR, P.R.; REIS e SOUSA, C. **Dectin-2 is a syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection.** J. Exp. Med. 206, 2037-2051. 2009.

ROEDER, A.; KIRSCHNING, C.J.; RUPEC, R.A.; SCHALLER, M.; WEINDL, G.; KORTING, H.C. **Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity.** Medical Mycology. 42, 485-498. 2004.

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

ROMANI, L. **Immunity to fungal infections.** Nature Reviews Immunology. 11, 275-288. 2011.

RIVITTI, E.A.; AOKI, V. **Deep fungal infections in tropical countries.** Clinics in Dermatology. (99)00010-3, 1999.

SAAG, M.S.; GRAYBILL. R.J.; LARSEN, R.A.; PAPPAS, P.G.; PERFECT, J.R.; POWDERLY, W.G.; SOBEL, J.D.; DISMUKES, W.E. **Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious diseases society of America.** Clin. Infect. Dis. 30, 710-718. 2000.

SAIJO, S.; IKEDA, S.; YAMABE, K.; KAKUTA, S.; ISHIGAME, H.; AKITSU, A.; FUJIKADO, N.; KUSAKA, T.; KUBO, S.; CHUNG, S.; KOMATSU, R.; MIURA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; SHIBUYA, K.; YAMAMOTO, N.; KAWAKAMI, K.; YAMASAKI, S.; SAITO, T.; AKIRA, S.; IWAKURA, Y. **Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*.** Immunity. 32, 681-691. 2010.

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

SAN BLAS, G. ***Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism**. Curv. Top. Med. Mycol. v.1, p.235-257, 1985.

SAN-BLAS, G. **Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis***. J. Med. Vet Mycol., v. 31, p. 99-113, 1993.

SAN BLAS, G.; SAN BLAS, F. **Molecular aspects of fungal dimorphism**. Crit. Rev. Microbiol. v.11, p. 101-127, 1985.

SAN-BLAS, G., RESTREPO, A., CLEMONS, K., STEVENS, D. A., SAN-BLAS, F., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L. R., FIGUEROA, J. I., HAMILTON, A. J., BARTHOLOMEW, M. A. et al. **Paracoccidioidomycosis**. J. Med. Vet Mycol**.** v. 30, Suppl 1, p. 59-71, 1992**.**

SAN-BLAS, G.; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. ***Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics**. Med. Mycol. v.40, p.225-42, 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.

SCHORODER, K.; SWEET, M.J.; HUME, D.A. **Signal integration between IFNg and TLR signaling pathways in macrophages.** 10.1016, 2006.

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

SEVERO, L.C.; GEYER, G.R.; LONDERO, A.T.; PORTO, N.S.; RIZZON, C.F. **The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis**. Mycopathologia. v.31 (2), p.115-8, 1979.

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

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

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

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

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. **Interferom-g and tumor necrosis factor-a determine resistance to *Paracoccidoides brasiliensis* infection in mice.** American Journalof Pathology. v.156. n.5. 2000.

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.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. **MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.** J. Exp. Med. 7;189(11):1777-82. 1999.

SHISHIDO, T.; NOZAKI, N.; TAKAHASHI, H.; ARIMOTO, T.; NIIZEKI, T.; KOYAMA, Y.; ABE, J.; TAKEISHI, Y.; KUBOTA, I. **Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 345. 1446-1453. 2006.

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.

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.

TAVARES, A.H.; MAGALHÃES, K.G.; ALMEIDA, R.D.N.; CORREA, R.; BURGEL, P.H.; BOCCA, A.L. **NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*.** PLOS Neglected Tropical Diseases. 7(12):e2595. 2013.

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

TEIXEIRA,M.M.; THEODORO, R.C.; CARVALHO, M.J.A.; FERNANDES, L.; PAES, H.C.; HAHN, R.C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S.S. **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus.** Molecular Phylogenetics and Evolution. 52:273-283. 2009.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; DERENGOWSKI, L.S.; NICOLA, A.M.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M.S. **Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidoides*.** Eukaryotic Cell. v.12. n.3. 380-389. 2013.

THEODORO, R.C.; TEIXEIRA, M.M.; FELIPE, M.S.S.; PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. **Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects.** Plos ONE. v.7. n.5. 2012.

TSAO, P., WEI, S.C., HUANG, M.T., LEE, M.C., CHOU, H.C., CHEN, C.Y., HSIEH, W.S. **Lipopolysaccharide-induced Notch sinagling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response.** Journal of Biomedical Science. 2011 .

TRINCHIERI, G.; SHER, A. **Cooperation on Toll-like receptor signals in innate immune defense.** Nat. Rev. Immunol. 7(3):179-90. 2007.

UNDERHILL, D.M.; ROSSNAGLE, E.; LOWELL, C.A.; SIMMONS, R.M. **Dectin-1 activates syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production.** Blood. 106, 2543-2550. 2005.

VALLE, A.C.F.; COSTA, R.B.L. Paracoccidioidomicose. In: BATISTA, R.S.; IGREJA, R.P.; GOMES, A.D.; HUGGINS, D.W. **Medicina tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. p. 934-58, 2001.

VAN DER HORST, C.M.; SAAG, M.S.; HAMILL, R.J.; GRAYBILL, J.R.; SOBEL, J.D.; JOHNSON, P.C.; TUAZON, C.U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B.L.; POWDERLY, W.G.; DISMUKES, W.E. **Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.** N. Engl. J. Med. 337, 15-21. 1997.

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

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

VISINTIN, A.; ILIEV, D.B.; MONKS, B.G.; HALMEN, K.A.; GOLENBOCK, D.T. **Md-2.** Immunobiology [SI]. v.211. n 6-8. P 437-47. 2006.

WAGER, C.M.L.; WORMLEY, F.L.Jr. **Classical versus alternative macrophage activation: the ying and yang in host defense against pulmonary fungal infections.** Mucosal Immunology. v.7.n.5. 2014.

WANKE, B. **Epidemiology of Paracoccidioidomicosys: an emerging health problem in the brasilian amazon region.** Anais do encontro internacional sobre Paracoccicioidomicose. Campos do Jordão, SP. v.7, p.39, 1999.

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.

WANKE, B.; AIDÊ, M.A. **Paracoccidioidomycosis.** J. Bras. Pneumol. 35(12):1245-1249. 2009.

WENG, A.P.; ASTER, J.C. **Multiple niches for Notch in cancer: context is everything.** Curr. Opin. Genet Dev. v.14, p. 48 –54, 2004.

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

WONGCHANA, W.; PALAGA, T. **Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages.** Cellular and Molecular Immunology. p. 1672-7681, 2011.

WU, J.; BRESNICK, E.H. **Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated**. Trends Biochem Sci. v.32 (10), p.477-85, 2007.

XU, H.; ZHU, J.; SMITH, S.; FOLDI, J.; ZHAO, B.; CHUNG, A.Y.; OUTTZ, H.; KITAJEWSKI, J.; SHI, C.; WEBER, S.; SAFTIG, P.; LI, Y.; OZATO, K.; BLOPEL, C.P.; IVASHKIV, L.B.; HU, X. **Notch-RBP-j signaling regulates the transcriptional factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization.** Nature Immunology. v.13. n.7. 2012.

XU, J.; CHI, F.; GUO, T.; PUNJ, V.; LEE, W.N.P.; FRENCH, S.W.; TSUKAMOTO, H. **Notch reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation.** The Journal of Clinical Investigation. v.125. n.4. 2015.

YABE, Y.; MATSUMOTO, T.; TSURUMOTO; T., SHINDO; H. **Immunohistological localization of Notch receptors and their ligands Delta and Jagged in synovial tissues of rheumatoid arthritis**. J. Orthop. Sci. v.10 (6), p.589-94, 2005.

ZELANTE, T.; De LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUCETTO, P.; KASTELEIN, R.A.; KOPF, M.; ROMANI, L. **IL-23 and the Th17 pathway promote infammation and impair antifungal immune resistance.** Eur. J. Immunol. 37:2695-2706. 2007.

ZENG, Q., JIN, C., AO, L., CLEVELAND, J.C., SONG, XU, D., FULLERTON, D.A., MENG, X.M. **Cross-talk between the toll-like receptor 4 and notch 1 pathways auguments the inflammatory response in the intersticial cells of stenotic human aortic valves.** Circulation. 126:S222-S230. 2012.

ZHANG, W.; XU, W.; XIONG, S. **Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization.** The Journal of Immunology. 184:6465-6478. 2010.

ZHANG, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; HAN, C.; CAO, X.; LI, N. **Notch signal suppresses toll-like receptor-triggered inflammatory responses in macrophages by inhibiting extracellular signal-regulated ½-mediated nuclear factor κB activation.** Journal of Biological Chemistry. v.287. n.9. 2012.

ANEXO