

CAMILA VICENTE BONFIM

***EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL E
DECTINA EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS
ESTIMULADOS PELO PARACOCCIDIOIDES
BRASILIENSIS***

CAMPINAS

2008

CAMILA VICENTE BONFIM

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **CAMILA VICENTE BONFIM**.
Campinas, 29 de agosto de 2008.

Prof(a). Dr(a). Maria Heloísa Souza Lima Blotta
Orientador(a)

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL E
DECTINA EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS
ESTIMULADOS PELO PARACOCCIDIODES
BRASILIENSIS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOÍSA SOUZA LIMA BLOTTA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO MAMONI

CAMPINAS

2008

Camila Vicente Bonfim

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL E
DECTINA EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS
ESTIMULADOS PELO *Paracoccidioides*
*brasiliensis***

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências
Biomédicas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI LUCIANO MAMONI

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B64e Bonfim, Camila Vicente
Expressão de receptores do tipo Toll e dectina em monócitos e neutrófilos estimulados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Camila Vicente Bonfim. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Maria Heloisa Souza Lima Blotta, Ronei Luciano Mamoni

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Receptores do tipo Toll. 3. Paracoccidioides brasiliensis. 4. Monócitos. I. Blotta, Maria helena Souza Lima. II. Mamoni, Ronei Luciano. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Expression of Toll-like receptors and dectin-1 in monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*

Keywords: • Paracoccidioidomycosis
• Toll like receptors
• Paracoccidioides brasiliensis
• Monocytes

Titulação: Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber

Data da defesa: 29 - 08 - 2008

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta –

2. Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida –

3. Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos –

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/08/2008

Ao Deus Bondade,
por iluminar este caminho
onde encontrei pessoas inesquecíveis!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta, por sua orientação e acompanhamento, mas principalmente por ter primeiro confiado em mim e me concedido à oportunidade de realizar este trabalho. Por isso, o reconhecimento que tivemos no último Congresso de Paracoccidiodomicose, foi tão importante! Muito obrigada!

Ao Dr Ronei Luciano Mamoni, por seu exemplo de dedicação e profissionalismo. Sua orientação, incentivo e apoio foram responsáveis pela conclusão deste projeto. Seu carinho e amizade vão ficar pra sempre marcados em minha alma! “Tio, muito muito muito obrigada por tudo!!!”

Aos meus pais, Victor e Edna, e ao meu irmão Murilo, pelo apoio sem medida! Pela torcida e orações a cada prova, a cada congresso, a cada apresentação. Mais do que ninguém, esta conquista é de vocês também!

Ao meu companheiro Dalmo, pela assessoria no inglês! Pela compreensão e paciência com minhas ausências ao longo destes anos de trabalho. E, sobretudo, por me ensinar a maior lição da minha vida! O sentido do Amor!

À Ângela, técnica de enfermagem do ambulatório do CIPOI-Unicamp, e a Luzia, bióloga do Laboratório de Micologia do Departamento de Patologia Clínica HC-Unicamp, pela competência e profissionalismo com os quais sempre pude contar!

Aos amigos Rômulo, Carol e Larissa, pela ajuda, conversas, confidências, cafés...
Obrigada por nossa amizade. Vocês tornaram o trabalho muito mais leve e divertido!!!

Aos amigos do laboratório de Imunologia Molecular e Celular: Márcia, Lisandra, Cristiane, Fernanda, Fabio, Munir e Ana Lucia, pelo apoio e respeito de todos.

Ao professor Aníbal do Departamento de Patologia Clínica da FCM-Unicamp, por disponibilizar seu laboratório para as análises de citometria.

A pesquisadora Sheley do Hemocentro-Unicamp, pela orientação nas análises de Q-RT-PCR.

A todos, obrigada por fazerem parte desta história!

*“Não é o muito saber que sacia e satisfaz,
mas o sentir e saborear internamente as coisas”*

Inácio de Loyola

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | xxxv |
| ABSTRACT | xli |
| INTRODUÇÃO | 47 |
| OBJETIVOS | 61 |
| CASUÍSTICA E MÉTODOS | 65 |
| 1. Casuística..... | 67 |
| 2. Cultivo das células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18 e Pb265)..... | 67 |
| 3. Obtenção de neutrófilos e monócitos do sangue periférico..... | 67 |
| 4. Co-cultura dos neutrófilos, monócitos com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> | 69 |
| 5. Análise da expressão de TLRs e dectina-1 por citometria de fluxo..... | 70 |
| 6. Análise da expressão de RNAm para TLRs, dectina-1, TNF- α , IL-10 e TGF- β por RT-PCR em tempo real..... | 74 |
| a) Extração de RNAm..... | 74 |
| b) Tratamento com DNase para eliminação de DNA genômico..... | 75 |
| c) Síntese de cDNA..... | 75 |
| d) Protocolo de RT-PCR em tempo real (Q-RT-PCR)..... | 76 |
| e) Padronização da técnica de Q-RT-PCR..... | 77 |
| f) Análise e validação dos resultados de Q-RT-PCR..... | 84 |
| 7. Avaliação da produção de citocinas por ELISA..... | 85 |
| 8. Análise estatística..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| RESULTADOS | 87 |
| 1. Análise da expressão de TLR-1, TLR-2, TLR-4 E Dectina-1 em monócitos e neutrófilos por Citometria de Fluxo..... | 89 |
| 2. Análise da expressão do RNAm para TLR-1, TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 em monócitos e neutrófilos..... | 106 |
| 3. Análise da expressão do RNAm para TNF- α , IL-10 e TGF- β , em monócitos..... | 114 |
| 4. Análise da produção de TNF- α , IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2) em sobrenadante de cultura através da técnica de ELISA..... | 116 |
| DISCUSSÃO | 123 |
| CONCLUSÃO | 135 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 141 |
| ANEXOS | 155 |

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|------------------------|--|
| PCM | paracoccidiodomicose |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CMSP | células mononucleares do sangue periférico |
| DC | células dendríticas . |
| dNTP | Desoxinucleotídeos |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FA | forma adulta ou crônica |
| FJ | forma juvenil ou aguda |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| HTT | hipersensibilidade tardia |
| IFN | Interferon |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| IMF | intensidade média de fluorescência |
| ITAM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MyD88 | <i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i> |
| NFAT | Fator Nuclear de Células T Ativadas |
| NF κ B | Fator Nuclear Kappa B |
| <i>P. brasiliensis</i> | <i>Paracoccidoides brasiliensis</i> |
| PAMPs | Padrão molecular associado a patógenos , |
| PI | PCM-infecção |

| | |
|----------|--|
| PRRs | Receptores de reconhecimento padrão |
| Q-RT-PCR | Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real |
| RNAm | Ácido ribonucléico |
| s/ est | Sem estímulo |
| Syk | <i>Spleen tyrosine kinase</i> |
| TGF | Fator de transformação de crescimento |
| Th1 | Linfócito T auxiliar tipo 1 |
| Th2 | Linfócito T auxiliar tipo 2 |
| TLRs | receptores do tipo Toll |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| UBC | Ubiquitina |
| Zym | Zimosan |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Estratégia para determinar a expressão de TLRs e dectina-1 por citometria de fluxo | 72 |
| 2 | Curvas de <i>melting</i> representativas de resultados obtidos em equipamento de PCR em tempo real | 78 |
| 3 | Gráficos de amplificação e curva padrão obtidos na padronização da eficiência das reações de Q-RT-PCR | 81-83 |
| 4 | Análise da expressão de TLR1 em monócitos por citometria de fluxo | 90 |
| 5 | Análise da expressão de TLR1 em neutrófilos por citometria de fluxo | 91 |
| 6 | Análise da expressão de TLR2 em monócitos por citometria de fluxo | 93 |
| 7 | Análise da expressão de TLR2 em neutrófilos por citometria de fluxo | 94 |
| 8 | Análise da expressão de TLR4 em monócitos por citometria de fluxo | 96 |
| 9 | Análise da expressão de TLR4 em neutrófilos por citometria de fluxo | 98 |
| 10 | Análise da expressão de dectina-1 em monócitos por citometria de fluxo | 100 |
| 11 | Análise da expressão de dectina-1 em neutrófilos por citometria de fluxo | 102 |
| 12 | Comparação entre marcação total e de superfície, para receptores da resposta imune inata em monócitos | 104-5 |
| 13 | Análise da expressão relativa do RNAm para TLRs e dectina-1 em monócitos de com LPS e zimosan | 107 |
| 14 | Análise da expressão do RNAm de TLR-1, por Q-RT-PCR, em monócitos estimulados com Pb18 e Pb265 | 108 |

| | | |
|----|--|-----|
| 15 | Análise da expressão do RNAm de TLR-2, por Q-RT-PCR, em monócitos estimulados com Pb18 e Pb265 | 109 |
| 16 | Análise da expressão do RNAm de TLR-4, por Q-RT-PCR, em monócitos estimulados com Pb18 e Pb265 | 109 |
| 17 | Análise da expressão do RNAm de dectina-1, por Q-RT-PCR, em monócitos estimulados com Pb18 e Pb265 | 110 |
| 18 | Análise da expressão do RNAm de TLR-1, por Q-RT-PCR, em neutrófilos estimulados com Pb18 e Pb265 | 111 |
| 19 | Análise da expressão do RNAm de TLR-2, por Q-RT-PCR, em neutrófilos estimulados com Pb18 e Pb265 | 112 |
| 20 | Análise da expressão do RNAm de TLR-4, por Q-RT-PCR, em neutrófilos estimulados com Pb18 e Pb265 | 113 |
| 21 | Análise da expressão do RNAm de dectina-1, por Q-RT-PCR, em neutrófilos estimulados com Pb18 e Pb265 | 114 |
| 22 | Análise da expressão do RNAm de TNF- α e TGF- β , por Q-RT-PCR, em monócitos estimulados com Pb18 e Pb265 | 115 |
| 23 | Análise da expressão do RNAm de IL-10, por Q-RT-PCR, em monócitos | 116 |
| 24 | Análise da produção de TNF- α em sobrenadantes de culturas de monócitos | 117 |
| 25 | Análise da produção de IL-10 em sobrenadantes de culturas de monócitos | 118 |
| 26 | Razão entre as quantidades de TNF- α e IL-10 (TNF- α /IL-10) em sobrenadantes de cultura de monócitos | 119 |
| 27 | Análise da produção de PGE ₂ em sobrenadantes de culturas de monócitos | 120 |
| 28 | Análise da produção de PGE ₂ em sobrenadantes de culturas de neutrófilos | 121 |
| 29 | Esquema do reconhecimento diferencial das cepas de <i>P brasiliensis</i> | 139 |

RESUMO

A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que pode apresentar-se sob diferentes formas clínicas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Trabalhos recentes têm demonstrado a importância da resposta inata no direcionamento da resposta adaptativa. Células do sistema imune inato reconhecem patógenos por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Dentre esses, podemos destacar a família dos receptores do tipo Toll (TLRs) e dos receptores de lectina do tipo C (CLRs), que possuem membros capazes de reconhecer antígenos fúngicos. Nosso trabalho teve por objetivo avaliar a expressão de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 (CLR) em macrófagos e neutrófilos de indivíduos saudáveis, após exposição a células leveduriformes das cepas de alta (Pb 18) e baixa (Pb265) virulência de *P. brasiliensis*. Como controle positivo foram utilizados os ligantes específicos para TLR-4 (LPS) e TLR-2 e dectina-1 (zimosan). A análise por citometria de fluxo revelou a redução da expressão de TLRs e dectina-1, mais evidente em monócitos do que em neutrófilos e após 30 minutos de estimulação, indicando que o reconhecimento dos antígenos fúngicos resulta na rápida internalização dos receptores. Houve uma tendência a um aumento da expressão relativa do RNAm de TLR-2 e dectina-1 em resposta à estimulação fúngica, em especial à cepa Pb265. A análise da produção de citocinas (RNAm e proteína) mostrou que as células fúngicas induzem a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, mas razão TNF- α /IL-10 diminuída em resposta ao zimosan e leveduras Pb265 indica uma produção relativa maior IL-10 nestas condições, enquanto que o estímulo com Pb18 privilegia a produção de TNF- α . Leveduras de

P. brasiliensis também estimulam a elevada produção de PGE₂ tanto por macrófagos como por neutrófilos, indicando a importância deste mediador na relação parasita-hospedeiro. Em conjunto, nossos resultados sugerem a participação do TLR-2, TLR-4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização do fungo, e conseqüente ativação da resposta imunológica ao *P. brasiliensis*. Além disso, no caso da infecção por Pb265 a indução de uma resposta inflamatória exacerbada seria contrabalançada pela maior produção de IL-10, o que levaria a um melhor controle da infecção pelo hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic mycosis in Latin America caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The pattern of the immune responses to *P. brasiliensis* determines the disease progression and clinical outcome. Innate immune response is mediated by phagocytic cells, such as macrophage and neutrophils, which ingest and kill invading pathogens and then trigger the adaptive immune system through the secretion of cytokines and chemokines. The C-type like lectin receptors (CLR) and Toll-like receptors (TLRs) are the two main PRRs for fungal cells. The purpose of the present study was to evaluate the expression of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 (CLR) in monocytes and neutrophils from healthy individuals after stimulation with Pb18 (high virulence) and Pb265 (low virulence) yeasts of *P. brasiliensis*. As positive controls we used specific ligands to TLR-4 (LPS), TLR-2 and dectin-1 (zymosan). Our results demonstrated a decreased of TLRs and dectin-1 expression more evident on monocytes than on neutrophils as soon as 30 minutes after yeast cells stimulation. This decrease was similar to the one caused by zymosan stimulation and indicates that up binding the complexes are rapidly internalized. There was a tendency towards an increased TLR2 and dectin-1 mRNA expression in response to fungal cells, mainly Pb265. *P. brasiliensis* yeast cells induced the production of proinflammatory and antiinflammatory cytokines (mRNA and protein) but the low ratio between TNF- α and IL-10 in response to zymosan and Pb265 point out to a preferential production of IL-10, while Pb18 predominantly induced TNF- α secretion. *P. brasiliensis* yeast cells also induced an elevated PGE₂ production by monocytes and neutrophils showing the important role of this mediator in fungus-

host relationship. Altogether our results suggest the participation of TLR2, TLR-4 and dectin-1 in *P. brasiliensis* recognition and internalization and consequent activation of the immune response against the fungus. Moreover, concerning Pb265 stimulation the induction of an exacerbate inflammatory response could be counterbalanced by an increased IL-10 production, resulting in an efficient control of the infection by the host.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica em diferentes regiões do Brasil, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), cujo habitat na natureza ainda é indefinido (Brummer et al., 1993)

Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolver a doença. Esse fato é evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (HTT) positivo para antígenos do fungo, mas não apresentam qualquer sintoma da doença (Bethlem et al., 1999). Essa condição, denominada PCM-infecção (PI), é muito mais comum do que a PCM-doença.

Quando a doença se estabelece, é caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, agrupadas em 2 formas principais: a forma adulta ou crônica (FA), geralmente de evolução mais lenta e menos agressiva, e a forma juvenil (FJ) ou aguda, mais grave. Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (Benard et al., 1996; Lacaz et al., 2002).

A forma juvenil ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos, representando menos de 10% da casuística geral da doença. A avaliação clínica desses pacientes evidencia a presença de adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando patologias linfoproliferativas. Nestes casos a evolução da doença é rápida, com febre, emagrecimento e comprometimento do sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço, linfonodos e

medula óssea). Os pacientes apresentam resposta imune humoral preservada, com aumento da produção de anticorpos específicos do tipo IgG4, IgE e IgA (Benard et al., 2001; Mamoni et al., 2001; Mamoni et al., 2002), enquanto a resposta imune celular a antígenos do fungo é bastante comprometida (Mota et al., 1985; Benard et al., 1996; Oliveira et al., 2002). A análise histopatológica das lesões mostra reação inflamatória não específica com formação de granulomas frouxos, observando-se multiplicação ativa do fungo dentro das células fagocitárias (Franco et al., 1987).

A forma adulta ocorre em aproximadamente 90% dos pacientes, com progressão lenta e insidiosa, podendo levar meses ou anos para se estabelecer, como resultado da reativação de um foco latente da infecção fúngica. Nestes pacientes a doença pode ser leve, moderada ou grave, com lesões que variam desde ulceração oral isolada até o envolvimento pulmonar difuso. Pode apresentar-se de forma localizada (unifocal), sendo o pulmão o órgão mais atingido, mostrando múltiplas lesões em todo o trato respiratório e manifestações clínicas como tosse, expectoração e dispnéia a esforços (revisto em Brummer et al., 1993). A forma crônica multifocal atinge mais de um órgão ou sistema, apresentando sintomas variados com lesões na mucosa oral, nasal, pele, linfonodos, e em menor escala nas glândulas adrenais, intestinos e sistema nervoso central (Franco et al., 1987; Brummer et al., 1993). A resposta imune humoral caracteriza-se pela produção de níveis elevados de anticorpos do tipo IgG1 na forma crônica unifocal, e de IgG4 e IgE na forma multifocal (Mamoni et al., 2001; Mamoni et al., 2002). Pacientes com a FA geralmente apresentam teste

intradérmico positivo e achados histopatológicos mostrando granulomas epitelióides típicos, que circundam as lesões e dificultam a multiplicação do fungo (Montenegro, 1986).

Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com a forma juvenil da PCM proliferam pouco e produzem preferencialmente citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5) em resposta à estimulação com antígeno de *P. brasiliensis*. Em contraposição, indivíduos com PI produzem IFN- γ , TNF- α e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, caracterizando uma resposta predominantemente Th1. Pacientes com a forma adulta constituem um grupo intermediário, no qual um perfil heterogêneo de resposta imune pode ser observado (Oliveira et al., 2002). Em estudo complementar também observamos, por meio de citometria de fluxo, que os indivíduos com PI apresentam uma porcentagem maior de células produtoras de IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL9 e CXCL10 em comparação com os pacientes FA e FJ da PCM (Mamoni e Blotta, 2006). *In vitro*, o IFN- γ tem um importante papel contra o fungo, pois é responsável por ativar os macrófagos, uma das principais células da resposta imune inata (Diniz et al., 2001; Bozzi et al., 2004),

A importância do IFN- γ reside na sua capacidade de ativar macrófagos residentes e conseqüentemente inibir o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*. Quando estas células não são ativadas, permitem a replicação dos fungos ingeridos (Brummer et al., 1993).

A expressão constitutiva de RNAm de IFN- γ em CMSP é maior em indivíduos com PI, que entraram em contato com o fungo, mas não

desenvolveram a doença, do que em pacientes com a FA, evidenciando o potencial destes indivíduos em desenvolver uma resposta do tipo Th1. Por outro lado, CMSP de pacientes com a FJ, caracterizada como uma forma da doença mais grave e disseminada, não expressam RNAm de IFN- γ de forma constitutiva (Mamoni e Blotta, 2005).

Em contrapartida, vários estudos associam a IL-10 a uma resposta deficiente ao *P. brasiliensis*. Altas concentrações de IL-10 são detectadas no sobrenadante de culturas de CMSP de pacientes de PCM, quando estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis*, enquanto que em culturas de células de pacientes tratados os níveis são bem menores (Diniz et al., 2001). Neworal et al. (2003) observaram um aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β , em linfonodos de pacientes com a forma juvenil da PCM, sugerindo que a estimulação da produção destes fatores pode representar um mecanismo de escape para o fungo, tornando os macrófagos refratários aos efeitos estimuladores do IFN- γ e contribuindo para a evolução da doença.

Por outro lado, trabalhos recentes apontam para um papel antiinflamatório protetor da IL-10 na fase inicial da doença, o que resguardaria o hospedeiro dos efeitos deletérios de uma resposta inflamatória exacerbada (Pina et al.; 2008).

Outro mediador inflamatório que participa da resposta inicial do hospedeiro ao fungo é a prostaglandina E₂ (PGE₂). Estudos recentes apontam que o *P. brasiliensis* é um forte indutor da produção de PGE₂ pelo hospedeiro, além do próprio fungo ser capaz de liberar este mediador (Bordon et al., 2007). Foi observado que a produção de concentrações elevadas de PGE₂ por macrófagos é

associada à imunossupressão (Edwards et al, 1986), podendo constituir então em um mecanismo de evasão exibido pelo patógeno.

Ainda não se sabe ao certo quais fatores influenciam o desenvolvimento das diferenças observadas na resposta imunológica adaptativa nas diversas formas da PCM, mas, provavelmente, componentes da imunidade inata devem desempenhar um papel importante no direcionamento do sistema de defesa do hospedeiro. Tradicionalmente considerada apenas a primeira linha de defesa, a resposta inata tem recebido renovada atenção, pois, apesar da especificidade limitada, distingue estruturas próprias e não próprias, ativando mecanismos da resposta adaptativa por meio de sinais específicos (Sansonetti, 2006),

Na resposta inata, a maioria dos mecanismos de defesa é induzida após a infecção e a sua ativação requer o reconhecimento de estruturas moleculares compartilhadas por um grande número de patógenos, também conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por um conjunto de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que inclui os receptores do tipo Toll (TLRs). As principais células da resposta imune inata que expressam TLRs são os monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Todos os TLRs ativam um conjunto de respostas estereotipadas, incluindo a inflamação. Entretanto, TLRs individuais também podem induzir programas específicos em células do sistema imune inato, que são moldadas para um patógeno em particular (Romani, 2004; Sansonetti, 2006).

Componentes estruturais altamente conservados presentes na parede das células fúngicas como β -glucanas, quitina e mananas são críticos para o

crescimento e a sobrevivência dos fungos e constituem PAMPs ideais, reconhecidos por TLRs expressos em fagócitos e células dendríticas (DC). Estudos recentes demonstraram um importante envolvimento dos TLRs no reconhecimento de fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides posadasii* e *Cryptococcus neoformans* (Shoham et al., 2001; Netea et al., 2002; Bellocchio et al., 2004; Yauch et al., 2004; Viriyakosol et al., 2005; Nakamura et al., 2006). Em camundongos deficientes de TLRs, bem como de moléculas sinalizadoras associadas aos TLRs, ficou claro que tanto o TLR-2 como o TLR-4 têm diferentes papéis na ativação de resposta imune inata. Tanto TLR-2 como TLR-4 podem ativar o NF- κ B e induzir a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias por macrófagos e células dendríticas demonstrando sua participação na resposta imune inata e no direcionamento da resposta adaptativa (Bellocchio et al., 2004). Netea et al. (2002) verificaram que camundongos deficientes em TLR-4 são mais susceptíveis à candidíase disseminada e que este efeito é mediado pela produção deficitária das quimiocinas KC e MIP-2, resultando em diminuição do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Também observaram que a produção de TNF e IL-1 β é fortemente dependente de TLR-2, sugerindo que uma mesma espécie de fungo é capaz ativar diferentes TLRs (Netea et al., 2002). Todos os TLRs (exceto TLR3) utilizam vias de sinalização intracelular que são dependentes do recrutamento da molécula adaptadora MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) (Akira Takeda, 2004). Desta forma, camundongos deficientes em MyD88 também apresentam alta suscetibilidade à infecção por *Candida albicans* devido a

atividade fagocítica deficiente e baixa produção citocinas (Bellocchio et al., 2004; Villamon et al., 2004).

Macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 e TLR2 infectados pelo *P. brasiliensis* possuem baixa atividade fagocítica, secretam baixas concentrações de NO, IL-12 e MCP-1 e maiores níveis de IL-10, mas estas alterações não refletem em maiores índices de mortalidade (Calich et al., 2008).

Células dendríticas de camundongos suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* apresentam aumento na expressão de TLR-2, associado à produção de níveis elevados de IL-10 e TNF- α , enquanto que DCs de camundongos resistentes apresentam menor expressão de TLR-2 e baixa produção de ambas as citocinas, demonstrando que o agente etiológico da PCM apresenta mecanismos capazes de modular a resposta imunológica inata via TLR-2 (Ferreira et al., 2007).

O TLR-2 é um dos PRRs com maior variedade de ligantes descritos, reconhecendo PAMPs de diferentes tipos de patógenos. Tal versatilidade de reconhecimento é devida, em grande parte, à sua capacidade de agir em conjunto com outras moléculas de TLRs como o TLR1 e TLR6 (Akira e Takeda, 2004). Dessa forma o TLR2 pode dar origem a diferentes tipos de resposta por parte das células que expressam essa molécula, originando tanto uma resposta pró-inflamatória (com produção de TNF- α e IL-12p70), como respostas anti-inflamatórias, principalmente pela indução da produção de IL-10, e que podem ser utilizadas por alguns patógenos como possível mecanismo de escape (Netea et al., 2006; Pathak et al., 2007).

Neutrófilos ativados via TLRs limitam a infecção por meio da fagocitose de patógenos, liberação de peptídeos anti-inflamatórios e citocinas pro-inflamatórias (Parker et al., 2005). Bellochio et al. (2004b) verificaram que TLRs expressos por neutrófilos polimorfonucleares murinos e humanos são capazes de reconhecer diferentemente hifas e conídios de *A. fumigatus*. Netea et al. (2003) também observaram que hifas de *A. fumigatus* são reconhecidas por TLR-4 e CD14, o mesmo não ocorrendo com leveduras, sugerindo que o reconhecimento morfo-específicos permite a evasão da resposta imune. Por outro lado, a cápsula de *C. neoformans*, composta de glucoronoxilomanana, ativa apenas parcialmente o TLR, o que explicaria a supressão e a falta de regulação da resposta imunológica do hospedeiro na vigência da criptococose (Shoham et al., 2001).

Ao lado dos TLRs, outros PRRs começam a ser estudados como os receptores da família das C-lectinas (dectina -1 e 2, DC-SIGN, receptores de manose). Dentre esses PRRs, destaca-se a dectina-1, com importante papel no reconhecimento de β -glucanos (Robinson et al., 2006) e conseqüentemente na resposta imunológica a infecções fúngicas (Dennehy e Brown, 2007).

Diferentemente de outros receptores da família das C-lectinas, a dectina-1 apresenta em sua porção intracitoplasmática um domínio ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) capaz de atuar como indutor de sinalização via fosforilação de uma tirosina kinase conhecida como Syk, levando a ativação do NFAT (Gross et al., 2006; Robinson et al., 2006; Goodridge et al., 2007).

Diversos estudos demonstram que a dectina-1 é importante tanto na resposta mediada por macrófagos e células dendríticas como naquelas mediadas

por neutrófilos (Goodridge et al., 2007; Kennedy et al., 2007). Esse receptor aparentemente apresenta diversos tipos de interação com os TLRs e o reconhecimento de patógenos por essas duas classes de moléculas dirige a resposta imunológica para diferentes caminhos, dependendo do tipo de combinação (Netea et al., 2006; Taylor et al., 2007; Dennehy et al., 2008).

A via da SyK kinases freqüentemente colabora na sinalização induzida pela via TLRs/MyD88. Dennehy et al. (2008) estimularam células do sangue periférico com pequenas doses de ligantes para TLR1/TLR2, TLR4 e TLR5 e observaram baixa produção de TNF, que foi fortemente incrementada com a ativação da Syk, através da estimulação com β -glucanos. Em macrófagos e células dendríticas, TLRs e dectina-1 são mediadores que se complementam na produção de citocinas, tais como IL-12 e TNF (Gantner et al., 2003), demonstrando que a colaboração no reconhecimento de componentes microbianos distintos por diferentes classes de receptores da resposta imune inata é crucial para o desenvolvimento da resposta inflamatória.

Na infecção por *C. albicans* a mudança do fungo da forma de levedura para a forma filamentosa é um passo fundamental para que a infecção seja bem sucedida. Quando se analisa a composição da parede celular observa-se que as leveduras apresentam uma grande quantidade de β -glucanos expostos, enquanto que nas formas filamentosas isto não ocorre (Heinsbroek et al., 2005). Estudos de infecção demonstraram que a forma de levedura ativa células fagocíticas por meio da combinação de TLR-2 e dectina-1, levando ao aumento da ativação de fatores de transcrição como o NF κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias

importantes para o controle da infecção (Heinsbroek et al., 2005; Netea et al., 2006; Goodridge et al., 2007; Taylor et al., 2007). Por outro lado, as formas filamentosas não interagem com a dectina-1, ativam as células apenas via TLR-2, induzindo um estado de supressão da resposta inflamatória, que leva a diminuição da capacidade de controle da infecção (Taylor et al., 2007).

Mais recentemente, estudos *in vitro* mostraram que o reconhecimento da *Candida albicans* via dectina-1 pode resultar na ativação de células Th17 com alto potencial inflamatório (Leibundgut-Landmann et al., 2007; Romani, 2008).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico e a mudança da forma miceliana para a forma de levedura é essencial para que a infecção seja bem sucedida (Brummer et al., 1993). San-Blas (1993) realizou estudo, no qual foi determinado que o dimorfismo do *P. brasiliensis* pode ser controlado pela síntese dos polissacarídeos, como os glucanos. O α -glucano é o principal polissacarídeo presente nas paredes celulares de leveduras, enquanto que na forma miceliana o β -glucano é o único polissacarídeo da categoria encontrada (San-Blas, 1993). Além disso, demonstrou-se que cepas mais virulentas do *P. brasiliensis* apresentam menor quantidade de β -glucano na composição de suas paredes, ao contrário das cepas com baixa virulência que apresentam grande quantidade desse carboidrato e induzem a uma resposta inflamatória bastante intensa (Silva et al., 1994). Estas informações nos sugerem que a composição da parede celular do *P. brasiliensis* pode estar relacionada com a modulação da resposta imune do hospedeiro, uma vez que estes componentes, em proporções variáveis, podem

interagir com diferentes receptores da resposta imune inata, direcionando o sistema de defesa.

A compreensão de como se desenrola a resposta imune inata do hospedeiro ao *P. brasiliensis* pode auxiliar a mapear o direcionamento da resposta adaptativa e, conseqüentemente, a buscar melhores intervenções clínica terapêuticas.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a exposição a leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* pode afetar os níveis de TLR1, TLR2, TLR4 e Dectina-1, (RNAm e proteína) em monócitos e neutrófilos de indivíduos normais.

Objetivos específicos.

- Verificar o efeito da exposição a leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* das cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) sobre a expressão do TLR-1, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 por citometria de fluxo.
- Verificar o efeito da exposição a leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* das cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) sobre a expressão do RNAm de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 por Q-RT-PCR.
- Avaliar se a exposição a leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* estimula a produção de mediadores inflamatórios (TNF- α e PGE₂) e anti-inflamatórios (TGF- β e IL-10) (RNAm e proteína)

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Para a realização dos experimentos foram coletados aproximadamente 80 mL de sangue periférico de indivíduos saudáveis, por meio de punção venosa, em tubos contendo heparina sódica. As amostras foram processadas como descrito abaixo, imediatamente após a coleta.

2. CULTIVO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *P. brasiliensis* (Pb18 E Pb265)

Células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis* foram mantidas em cultura por 5 dias em meio Fava-Neto no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Após este período, as leveduras foram lavadas com PBS estéril e os grumos de células foram desfeitos com auxílio de pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e homogeneização intensa em agitador Vortex por 5 minutos, para facilitar a contagem e a verificação da viabilidade celular. A contagem foi realizada em hematocitômetro na presença de verde de Janus.

Nos experimentos foram utilizadas suspensões de células leveduriformes com viabilidade superior a 85%.

3. OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas por centrifugação em Ficoll-Hypaque, densidade 1.077 (GE Healthcare, Buckinghamshire - UK) a 2300 rpm, 20° C, por 30 minutos, lavadas com PBS gelado e contadas em hematocitômetro.

Os monócitos foram isolados por meio de seleção positiva utilizando-se anticorpos específicos anti-CD14 acoplados a esferas metálicas (MACS, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach - Germany). Para isso, as CMSP foram centrifugadas (300 x g por 10 minutos a 4°C), ressuspendidas em tampão de isolamento (PBS-BSA 1% - EDTA 2mM) em uma concentração de até 10×10^7 células em 80 μ L, às quais foram adicionados 20 μ L do anticorpo anti-CD14 acoplado a esferas metálicas. A suspensão foi incubada por 15 minutos a 4°C, quando então se adicionou 2 mL de tampão (PBS-BSA-EDTA), seguido de centrifugação (300 x g por 10 minutos a 4°C). Em seguida as células foram ressuspendidas em 500 μ L de tampão (PBS-BSA-EDTA) e passadas em coluna preenchida com malha metálica (coluna LS, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach - Germany), encaixada em aparato magnético (MidiMACS, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach - Germany). Após 3 lavagens com 3 mL de tampão PBS-BSA-EDTA cada para retirada das células não selecionadas, a coluna foi separada do magneto e lavada com 5 mL de tampão PBS-BSA-EDTA, aplicando-se pressão por meio de êmbolo. As células obtidas foram então centrifugadas (300 x g por 10 minutos a 4°C), ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro humano AB normal (10%), L-glutamina (2%) e gentamicina (0,05%) e utilizadas na concentração de 2×10^6 células/mL.

Para a obtenção dos neutrófilos foi utilizado o *buffy-coat* (camada de leucócitos que se deposita diretamente sobre as hemácias) remanescente da centrifugação inicial. Aproximadamente 2mL do *buffy-coat* foram ressuspendidos em meio RPMI para um total de 10mL e centrifugado sobre uma solução de Ficoll-

Hypaque com densidade de 1.119, por 30 minutos a 20°C a 2300 rpm. A camada de neutrófilos foi coletada com auxílio de pipeta Pasteur, lavada 2 vezes com meio RPMI (1250 rpm, por 10 minutos a 20°C) e ressuspensa na concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado.

A análise por citometria de fluxo das populações obtidas mostraram uma pureza de 90-95%, tanto de monócitos (células CD14⁺), como de neutrófilos (células CD16⁺).

4. CO-CULTURA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS COM CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *P. brasiliensis*

Neutrófilos e monócitos foram incubados separadamente a 37° C em estufa com 5% de CO₂ na presença, ou não, de leveduras de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 ou Pb265, em uma proporção de 1 célula fúngica para cada 50 células efetoras – 1:50), ou dos seguintes estímulos específicos: LPS (1µg/mL) ou zimosan (10µg/mL). Para os experimentos de citometria de fluxo as células foram incubadas por 30 e 60 minutos e para a realização dos testes de RT-PCR por 15 e 30 minutos, conforme estabelecido em experimentos de padronização.

Para a extração do RNA total após cada período de incubação, as células foram coletadas por meio da lavagem das placas com PBS-azida sódica 2mM e o *pellet*, obtido pela centrifugação a 3000 RPM por 5 minutos a 4° C foi congelado a -80° C até o momento do uso. Para a realização da imunofluorescência e análise por citometria de fluxo, após os períodos de incubação as células foram coletadas, como descrito acima, centrifugadas (1250 rpm por 10 minutos a 4°C) e

ressuspendidas em volume apropriado de tampão de imunofluorescência (PBS-BSA 1%-Azida sódica 2mM – PBS-B-A).

Todos os meios e tampões utilizados na preparação e realização das culturas foram testados com *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) – Piretoll (Associated Cape Cód Incorporated – Faumouth, MA) para detecção de eventual contaminação com LPS.

5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TLRs E DECTINA-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Após cada período de incubação as placas de cultura foram colocadas sobre gelo, mantidas em geladeira por 15 minutos e então as cavidades foram lavadas diversas vezes com PBS-azida sódica [2mM] para a completa remoção dos monócitos e neutrófilos. A seguir, as suspensões foram centrifugadas (1250 rpm, 10 minutos a 4°C), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas para uma concentração de 1×10^7 células/mL em tampão PBS-BSA[0,5%]-azida sódica [2mM] (PBS-BSA-A). Posteriormente, 20 μ L dessa suspensão de células (aproximadamente 2×10^5 células) foram transferidos para uma placa de 96 cavidades com fundo em U para a realização da técnica de imunofluorescência. Anticorpos anti-TLR1, anti-TLR2 e anti-TLR4, marcados com biotina (R&D Systems, Minneapolis - USA), e anti-dectina-1 (mouse IgG2b - R&D Systems, Minneapolis - USA) foram adicionados à suspensão de células. Adicionalmente, os monócitos foram marcados com anti-CD14 e os neutrófilos com anti-CD16 conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluídos em

PBS-BSA-A. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente as cavidades receberam 150 μL de tampão PBS-BSA-A e a placa foi centrifugada (1250 rpm por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas novamente com 100 μL de tampão de lavagem e ressuspensas em uma solução PBS-BSA-A com estreptoavidina conjugada com ficoeritrina (PE) para a detecção de TLR1, TLR2 e TLR4. Para a detecção de dectina-1 foi utilizada uma solução PBS-BSA-A contendo anticorpo anti-IgG2b de camundongo conjugada a PE (Caltag™ Laboratories – Invitrogen, Carlsbad - USA). Após nova incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 100 μL de PBS-BSA-A por cavidade, a placa foi centrifugada (1250 RPM, 10 minutos a 4°C), o sobrenadante descartado, seguindo-se nova lavagem com 100 μL de PBS-BSA-A. Finalmente o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 μL de formaldeído a 2%, transferidas para tubos de microtitulação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur – Beckton & Dickinson, Franklin Lakes - USA), por meio de *software* específico (CellQuest – Beckton & Dickinson, Franklin Lakes - USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas e/ou intensidade média de fluorescência (IMF), para cada parâmetro analisado.

Na figura 1 está esquematizada a estratégia utilizada para a análise da expressão dos receptores em monócitos (figura 1: A - E) e neutrófilos (figura 1: F - J).

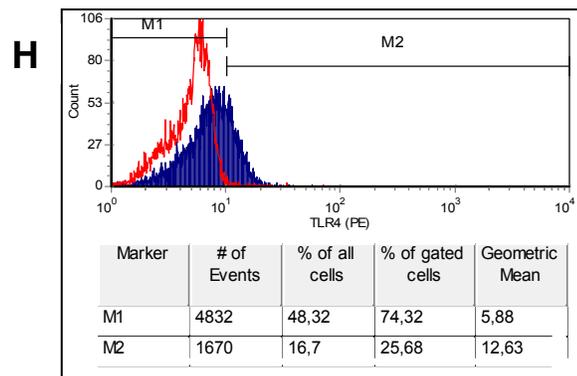
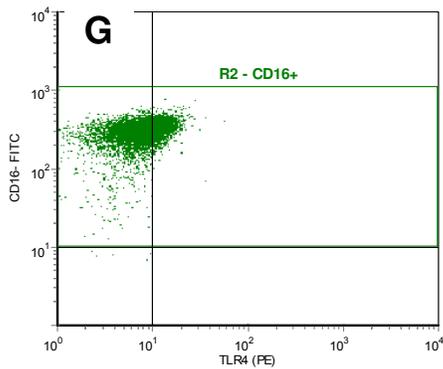
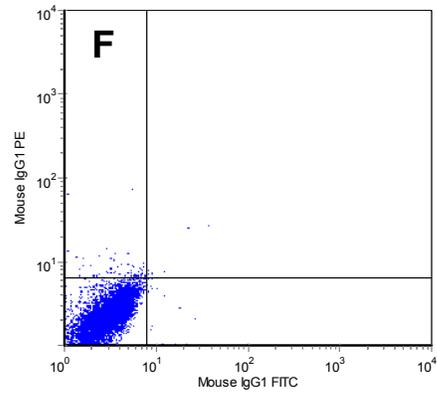
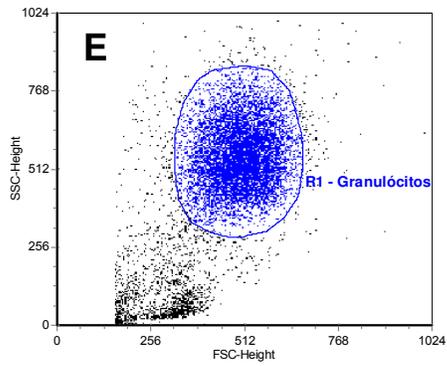
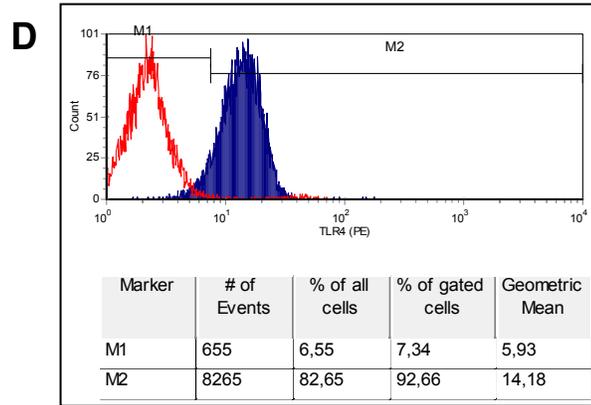
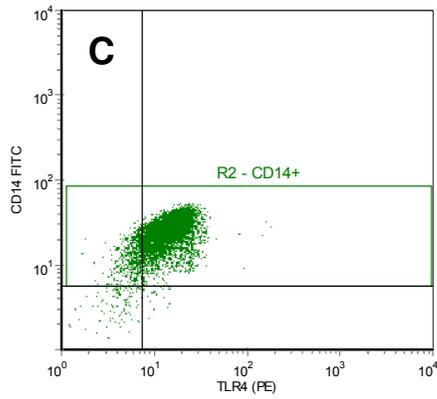
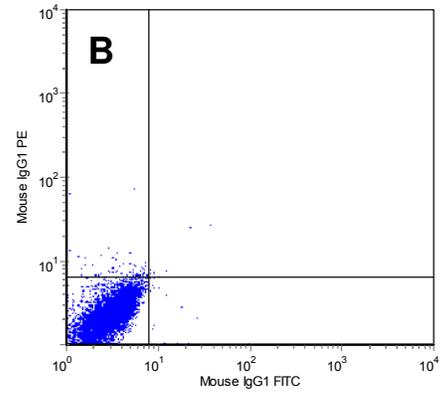
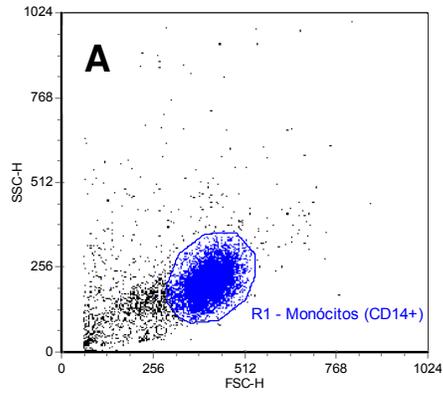


Figura 1 (página anterior): Estratégia para determinar a expressão de TLRs e dectina-1 (% de células positivas e intensidade média de fluorescência) em monócitos (**A – D**) e neutrófilos (**E - H**). Após a aquisição, foi gerado um gráfico de *dot-plot* (**A** e **E**) no qual pela análise da distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) foi delimitada a 1ª região de análise (R1 – monócitos ou R1 - granulócitos). A partir da região R1 foi gerado outro *dot-plot* (**C** e **G**) agora com as marcações específicas (FL1-CD14 ou CD16 e FL2 TLRs – no exemplo TLR4), nesse *dot-plot* foi delimitada uma nova região (R2 – Células CD14⁺ ou R2 – células CD16⁺). A partir da combinação das regiões R1 e R2 foi gerado então um histograma (**D** e **H**), no qual foi delimitada a região de células negativas para a fluorescência (M1), dado pelo controle de isotipo (em vermelho) e a região de células positivas (M2), a partir do qual foi validada a % de células dentro das regiões analisadas (*% of gated cells*) e a intensidade média de fluorescência (*geometric mean*) (tabela abaixo do histograma - **D** e **H**) de cada parâmetro (em azul). Os gráficos **B** e **F** representam o controle de isotipo, por meio do qual os quadrantes negativo, simples-positivos e duplo-positivo foram delimitados.

6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm PARA TLRs, DECTINA-1, TNF- α , IL-10 E TGF- β POR RT-PCR EM TEMPO REAL

a) Extração de RNAm

Para a extração do RNAm foram adicionados, vagarosamente, 500 μ L de Trizol (Invitrogen, Washington - USA) ao *pellet* de células, sob agitação, procedendo-se a homogeneização até sua completa dissolução. Foram então adicionados 2 μ L de glicogênio [20 μ g/ μ L] a cada tubo para atuar como carreador e 100 μ L de clorofórmio, seguido de agitação (vortex) por 10 segundos. A solução foi incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12000 x g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo no qual foi adicionado igual volume de isopropanol (\pm 250 μ L). A solução foi agitada (vortex) por 10 segundos e incubada a -20°C por 45 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram removidos cuidadosamente, sendo adicionado 1 mL de etanol a 75% seguido de nova centrifugação por 10 minutos a 12000 x g à temperatura ambiente. O etanol foi então removido e o *pellet* de RNA dissolvido em 35 μ L de tampão Tris-EDTA (TE).

A quantidade de RNAm foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro a 260 nm. A pureza do RNA obtido foi inferida pela razão entre as absorvâncias obtidas a 260 nm e 280 nm.

b) Tratamento com DNase para eliminação de DNA genômico

Antes da síntese do cDNA, as amostras de RNA obtidas foram submetidas ao tratamento com DNase para a remoção de possíveis cadeias de DNA genômico contaminante. Para tanto, 1µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,6 µL e foram acrescentados 4,4 µL do mix contendo 3,1µL de tampão 10x concentrado e 1µL de DNase humana I (Ambion - Applied Biosystems, California, USA). A seguir as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 minutos para a remoção do DNA. Após essa incubação foram adicionados a cada tubo 0,31µL de EDTA pH 8.0 - 0,5M, e as amostras incubadas a 75°C por 10 minutos para remoção da atividade enzimática da DNase.

c) Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total (tratado com DNase I) por tubo, diluído em água DEPC. Ao tubo de reação foram então adicionados 1,5 µL de oligo-dT₁₂₋₁₈ [500µg/mL] e esta mistura foi aquecida a 70° C por 10 minutos e transferida rapidamente para gelo. Após a incubação, foram adicionados 18 µL da seguinte mistura: 10 µL de tampão de síntese 5X; 2,5 µL de dNTP [10 mM]; 5 µL de DTT [0,1 M]; 0,5 µL de Superscript R/T II [200U/µL]. A solução foi homogeneizada gentilmente, centrifugada rapidamente e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de incubação a 40° C por 50 minutos. A atividade enzimática foi removida incubando-se as amostras a 90° C por 5 minutos, seguida por incubação a 4° C por 5 minutos. O cDNA obtido foi estocado a -80° C até o momento de uso.

d) Protocolo de RT-PCR em tempo real (Q-RT-PCR)

O Q-RT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, California, USA) utilizando metodologia com corante intercalante SybrGreen. Em cavidades de placas de 100 μ L foram adicionados 3 μ L de cDNA (ou de água no caso do controle negativo), 1 μ L do primer sense e 1 μ L do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 80 pM/reação (tabela I - previamente titulados, dados não mostrados) e 5 μ L do *master mix*, contendo dNTP, Taq polimerase, MgCl₂, SybrGreen, e tampão (Absolute SYBRGreen RT-PCR mix, Applied Biosystems). As amostras foram colocadas no equipamento de PCR em tempo real e submetidas a 40 ciclos de amplificação: 95°C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

Tabela 1: Seqüência dos primers utilizadas na técnica de q-RT-PCR

| Primer | Seqüência (5´- 3´) |
|---------------|--|
| UBC | Sense – ATT TGG GTC GCG GTT CTTG Anti-sense – TGC CTT GAC ATT CTC GAT GGT |
| GAPDH | Sense - CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT Anti-sense - GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC AGA GT |
| Dectin-1 | Sense – AAG GAT CGT GTG CTG CAT CTC Anti-sense - CAC CAG TAT TAC CAA GCA TAG GAT TC |
| TLR1 | Sense - AGG GTC AGC TGG ACT TCA GA Anti-sense - CGA ACA CAT CGC TGA CAA CT |
| TLR2 | Sense - ATT GTG CCC ATT GCT CTT TC Anti-sense - CTT CCT TGG AGA GGC TGA TG |
| TLR4 | Sense - TCC ATA AAA GCC GAA AGG TG Anti-sense - GAT ACC AGC ACG ACT GCT CA |
| IL-10 | Sense – GGC CAG GGC ACC CAG TCT Anti-sense – TCG AAG CAT GTT AGG CAG GTT |
| TNF- α | Sense – TGG CCC AGG CAG TCA GA Anti-sense – GGT TTG CTA CAA CAT GGG CTA CA |
| TGF- β | Sense – TGA GGG CTT TCG CCT TAG C Anti-sense – CGG TAG TGA ACC CGT TGA TGT |

e) Padronização da técnica de Q-RT-PCR

Para avaliar a especificidade dos primers utilizados, para cada gene analisado foi elaborada uma curva de *melting*, (aquecimento gradual da amostra amplificadas de 60°C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual é possível observar a temperatura em que ocorre a dissociação da dupla fita de DNA dos produtos de amplificação. Como essa temperatura depende do tamanho e da composição de bases nitrogenadas de cada produto, para cada gene analisado deve haver a formação de apenas um pico, com uma temperatura característica para cada produto de amplificação (Figura 2).

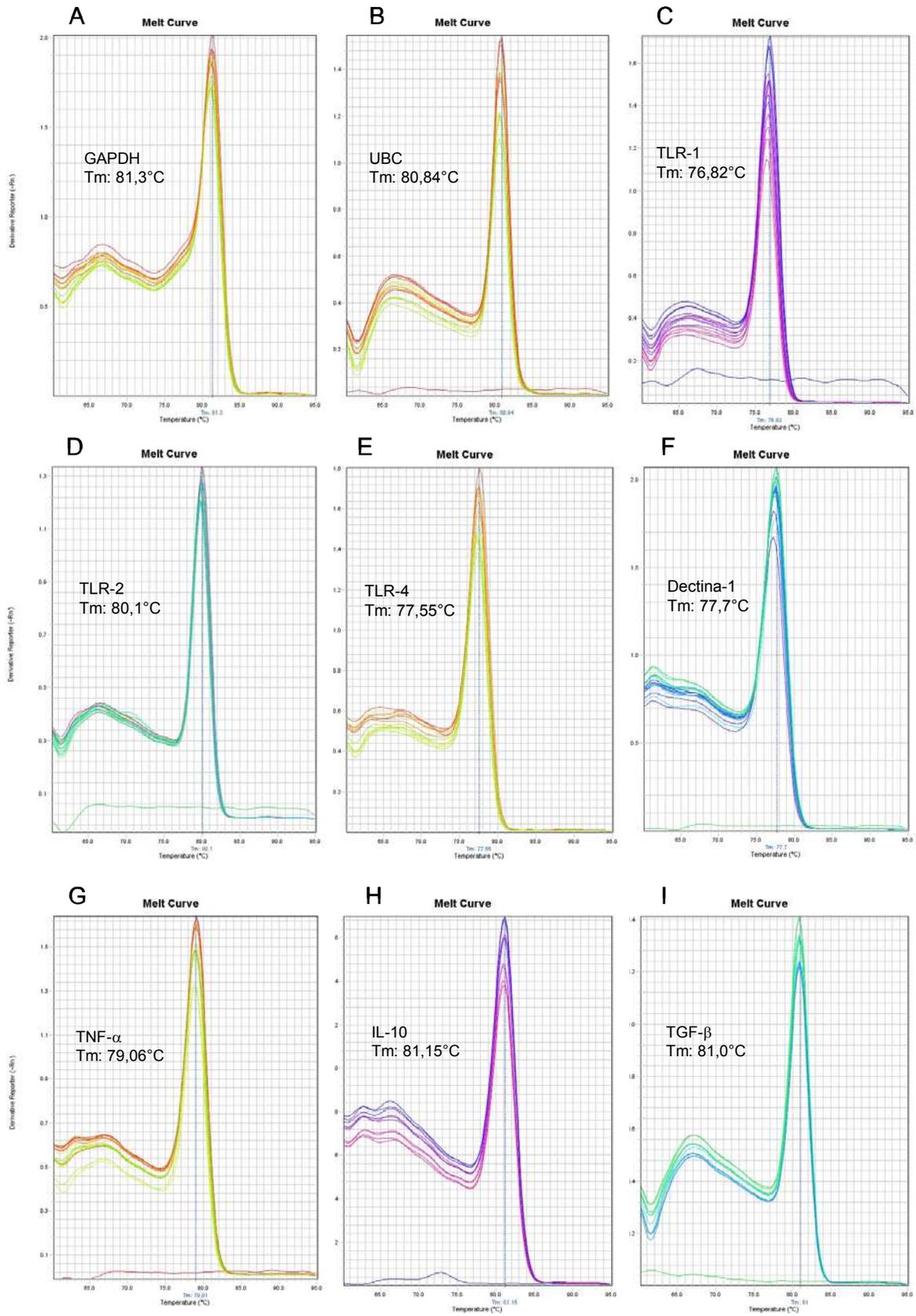


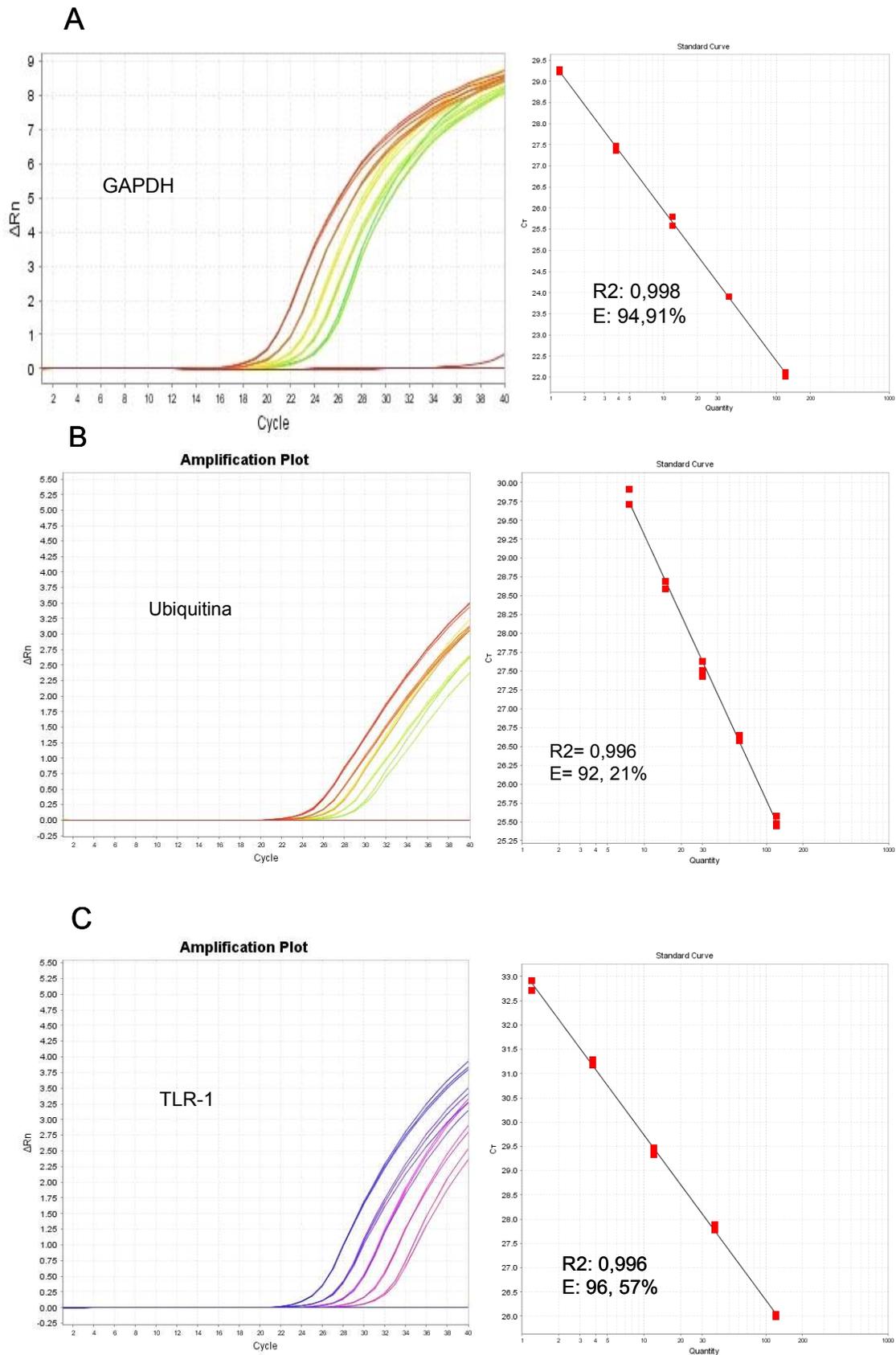
Figura 2 (página anterior): Curvas de *melting* representativas de resultados obtidos em equipamento de PCR em tempo real, após a realização de testes de amplificação do RNAm para GAPDH (**A**), Ubiquitina (**B**), TLR1 (**C**), TLR2 (**D**), TLR4 (**E**), dectina-1 (**F**), TNF- α (**G**), IL-10 (**H**) e TGF- β (**I**). As reações utilizando os *primers* na concentração ideal podem ser consideradas específicas, uma vez que todas as amostras testadas apresentam temperatura de *melting* idênticas (em destaque em cada gráfico)

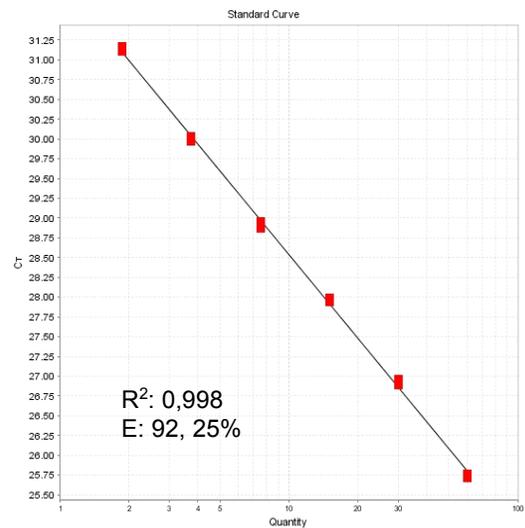
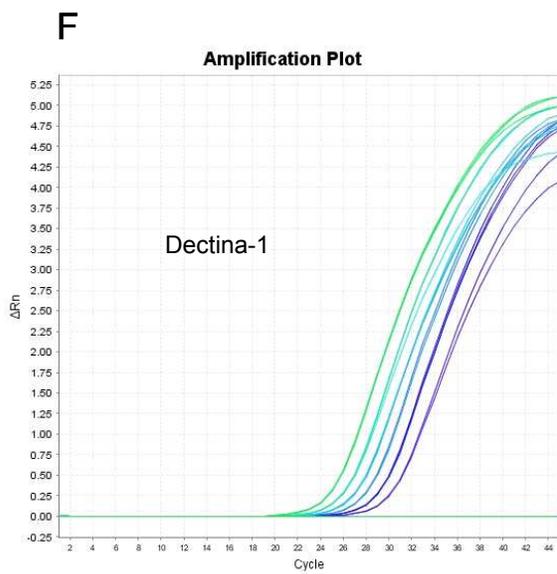
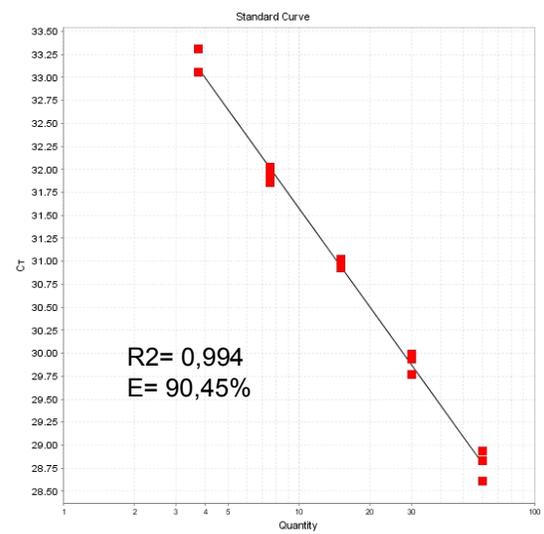
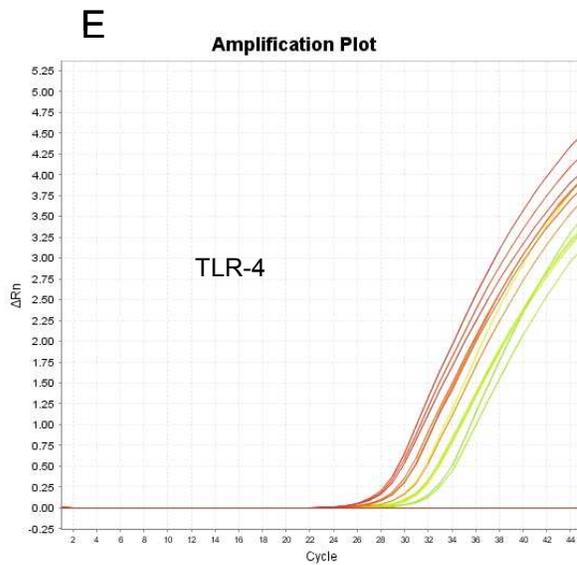
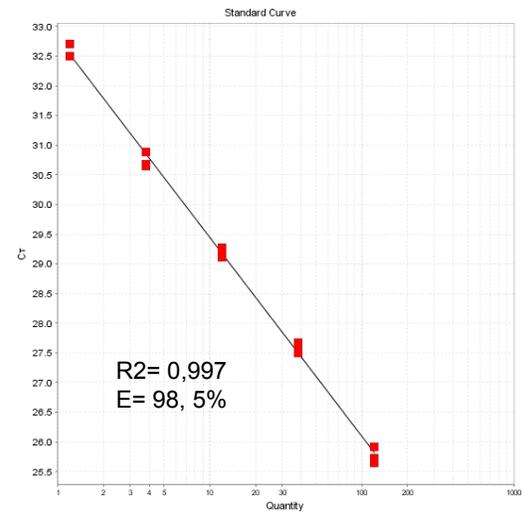
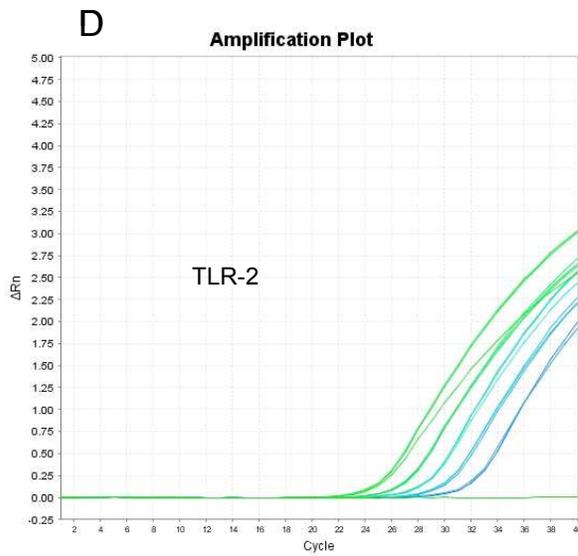
A eficiência da reação de amplificação também foi determinada para cada gene analisado (figura 3). Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA diluídas inicialmente a 1:10 e a seguir de forma seriada na proporção de 1:2 (5 a 6 pontos). Após o término da reação foi elaborada uma curva padrão, por meio da qual foi calculada a eficiência (E) e a correlação entre os pontos da curva (R^2). A eficiência da reação (E) indica a capacidade de amplificação dos reagentes utilizados (primers e enzimas) a cada ciclo. Uma eficiência de 100% indica que a cada ciclo a quantidade de produto em cada reação dobra. De acordo com a literatura, são consideradas satisfatórias reações com eficiência compreendidas entre 90 e 110%. Os valores de R^2 indicam a reprodutibilidade da pipetagem dos reagentes, sendo satisfatórios valores de R^2 de ao menos 0,9.

Nas figuras abaixo (figura 3) estão demonstradas as curvas de amplificação das amostras diluídas seriadamente (lado esquerdo) e a curva padrão obtida, nos quais se encontram destacados os valores de eficiência (E) e R^2 de cada gene

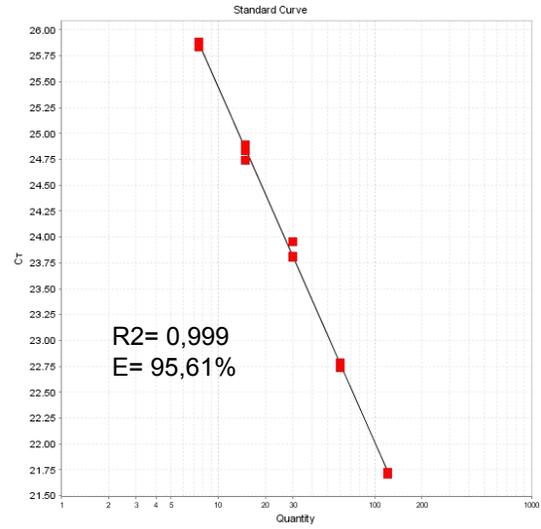
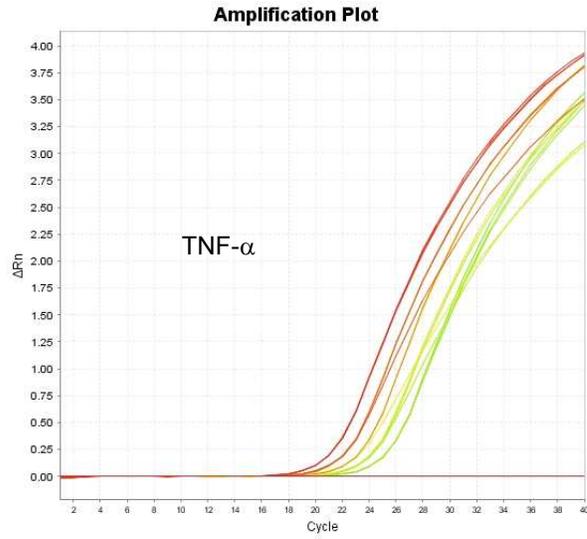
analisado. Todas as reações realizadas demonstraram valores dentro das faixas consideradas satisfatórias. Os valores de eficiência de amplificação da cada gene foram utilizados para o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse, conforme descrito no item abaixo.

Figura 3 (páginas seguintes): Gráficos de amplificação (esquerda) e curva padrão (direita) obtidos na padronização da eficiência das reações de Q-RT-PCR para quantificação do RNAm de GAPDH (**A**), Ubiquitina (**B**), TLR1 (**C**), TLR2 (**D**), TLR4 (**E**), dectina-1 (**F**), TNF- α (**G**), IL-10 (**H**) e TGF- β (**I**). Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA diluídas na proporção de 1:10 e a seguir de forma seriada na proporção de 1:2 (5 pontos a 6 pontos). Os gráficos mostram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras (lado esquerdo), a partir da qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos Cts em função da diluição da amostra (direita). Os valores de R^2 e da eficiência da reação estão destacados em cada gráfico.

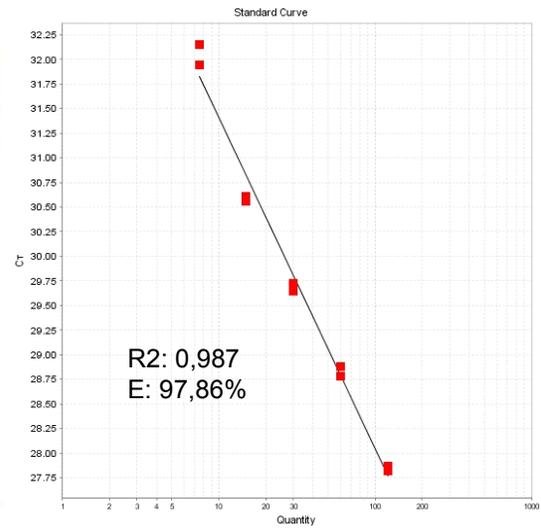
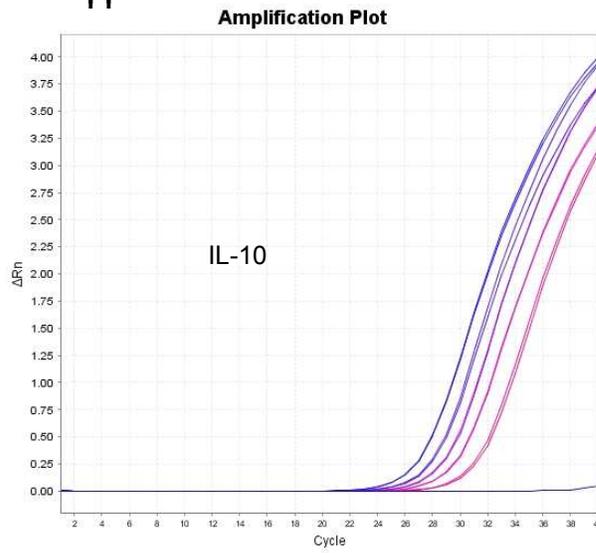




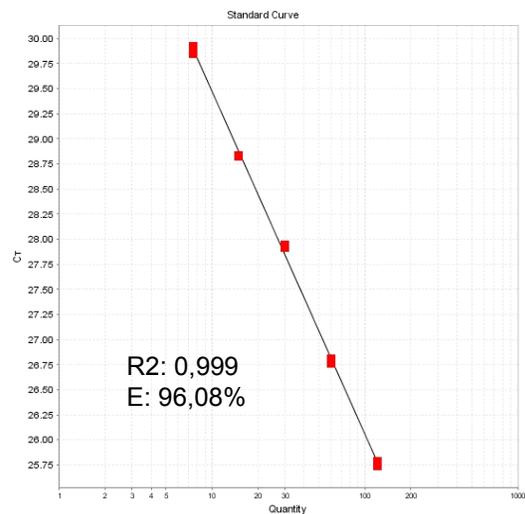
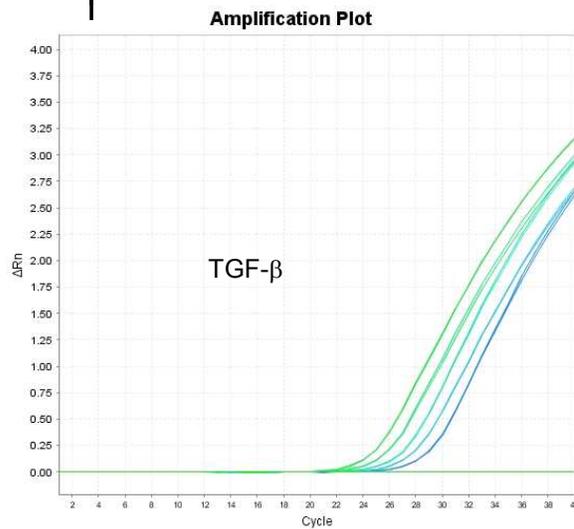
G



H



I



f) Análise e validação dos resultados de Q-RT-PCR

A análise dos resultados foi feita pelo método descrito por Vandensompele et al. (2002), no qual são utilizados pelo menos dois genes de expressão constitutiva para a normalização da expressão do gene de interesse. A utilização desses múltiplos genes para a normalização visa garantir a confiabilidade na estabilidade dos genes utilizados como referência. Esta medida é baseada no princípio de que a razão ideal de expressão dos genes controles é idêntica em todas as amostras, independente da condição de experimental. Tal cálculo é feito em um programa desenvolvido pelos pesquisadores citados acima (GeNorm – Visual Basic Application – VBA) e disponível gratuitamente na *Internet*.

Para utilização do programa primeiramente os dados obtidos na amplificação de cada gene em cada amostra (controles e de interesse) são transformados em quantidades relativas de acordo com a seguinte fórmula:

$$Q = E^{(Ct \text{ mínimo} - Ct \text{ da amostra})}$$

Onde **Q** é a quantidade relativa; **E** é a eficiência da reação de amplificação de cada gene (descrita no item anterior); **Ct mínimo** é o menor Ct obtido dentre as amostras testadas para determinado gene (amostra com maior expressão do gene) e o **Ct da amostra** é o Ct obtido de cada amostra analisada.

Os valores de Q obtidos dos genes controle (GAPDH e Ubiquitina) em cada amostra são então inseridos na planilha do programa (GeNorm) que calcula os valores médios de estabilidade do gene, frente as diferentes condições experimentais (M). O valor de M é variável, e em geral espera-se que se obtenha um valor menor que 1,5 (<1,5). Para os genes utilizados nesse trabalho como controle (GAPDH e Ubiquitina), obtivemos valores dentro da faixa indicada (dados

não mostrados). Após o cálculo do valor de M o programa calcula para cada amostra o valor de um fator de normalização (F), que é então utilizado para o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse em cada amostra analisada (divide-se o valor de Q obtido para o gene de interesse em cada amostra pelo fator de normalização correspondente) (Vandensompele et al, 2002).

7. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

Para avaliar se a estimulação de monócitos e neutrófilos induzia a produção de mediadores inflamatórios ou anti-inflamatórios, as concentrações de TNF- α , IL-10 (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis - USA) e prostaglandina E₂ (Biotrak™ (EIA) System GE Healthcare, Buckinghamshire - UK) foram determinadas pelo método de ELISA em sobrenadantes de culturas de células estimuladas com *P. brasiliensis* (cepas Pb18 ou Pb265), LPS e zimosan, nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente, por 4 e 24 horas.

Os testes de ELISA foram feitos conforme instruções fornecidas pelos fabricantes.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação de dados pareados obtidos entre os diferentes estímulos aplicados nas diferentes populações celulares foi feita com o teste não paramétrico de Wilcoxon, enquanto que a comparação dos resultados obtidos dos diversos grupos submetidos a diferentes estímulos foi realizada com testes não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando-se o software GraphPad Prism v. 5.00

(GraphPad Software, Inc.). Foram consideradas significantes diferenças com valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. Análise da expressão de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em monócitos e neutrófilos por Citometria de Fluxo

A primeira parte do trabalho teve por objetivo avaliar a expressão de receptores do tipo Toll (TLR-1, TLR-2 e TLR-4) e de dectina-1 em monócitos e neutrófilos de doadores normais estimulados por células leveduriformes de *P. brasiliensis* das cepas Pb18 e Pb265, por citometria de fluxo. Como controles positivos foram utilizados LPS e zimosan.

A estimulação de monócitos por 30 ou 60 minutos com LPS, zimosan, Pb18 ou Pb265 não alterou a frequência de células positivas para TLR1 (figura 4 A e B, lado direito). Entretanto, após o estímulo por 30 minutos com LPS ou com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (de ambas as cepas analisadas) houve uma diminuição significativa na quantidade de receptores de superfície, medida pela intensidade média de fluorescência, fato que não ocorreu em células estimuladas com zimosan (figura 4A, lado esquerdo).

Após 60 minutos de estímulo as diferenças foram menos acentuadas, com exceção da diminuição da intensidade de fluorescência na presença de LPS (figura 4 B, lado esquerdo).

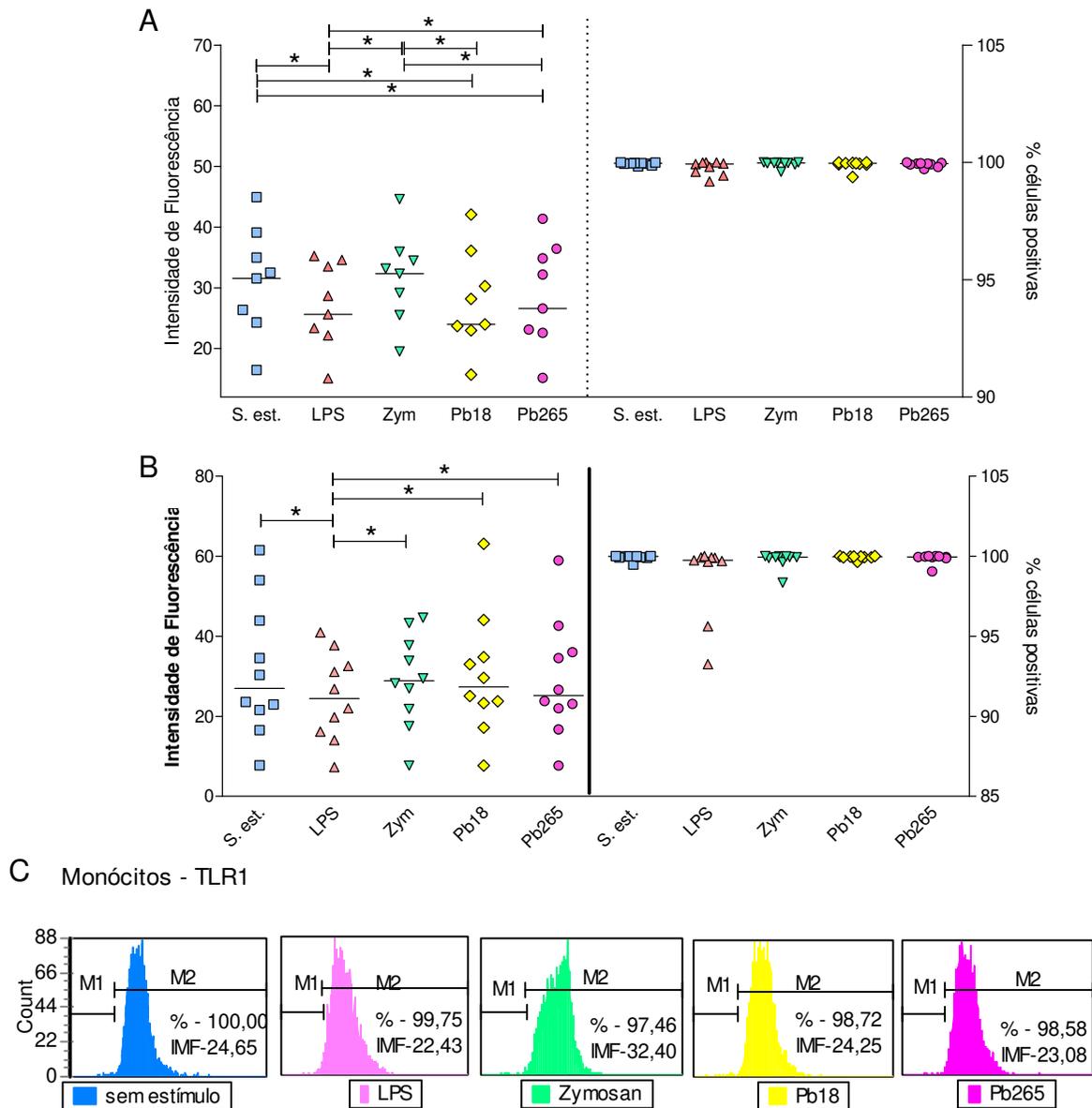


Figura 4 - Análise da expressão de TLR1 em monócitos não estimulados e estimulados por 30 minutos (**A** e **C**) ou 60 minutos (**B**) com LPS (1 μ g/mL), zimosan (zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon. **C**) Histogramas representativos da citometria de fluxo de monócitos (células CD14+) de um indivíduo, não estimulados ou estimulados com LPS, zimosan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 e Pb265).

A comparação da expressão do TLR-1 frente aos diversos estímulos na população de neutrófilos, após 30 (figura 5A) e 60 minutos (figura 5B) de incubação, não demonstrou diferenças significativas, tanto em relação à intensidade de fluorescência (lado esquerdo), quando à porcentagem de células positivas (lado direito) para esse marcador. Observamos que essas células apresentaram uma variação muito maior na porcentagem de células positivas, quando comparada àquela observada nos monócitos.

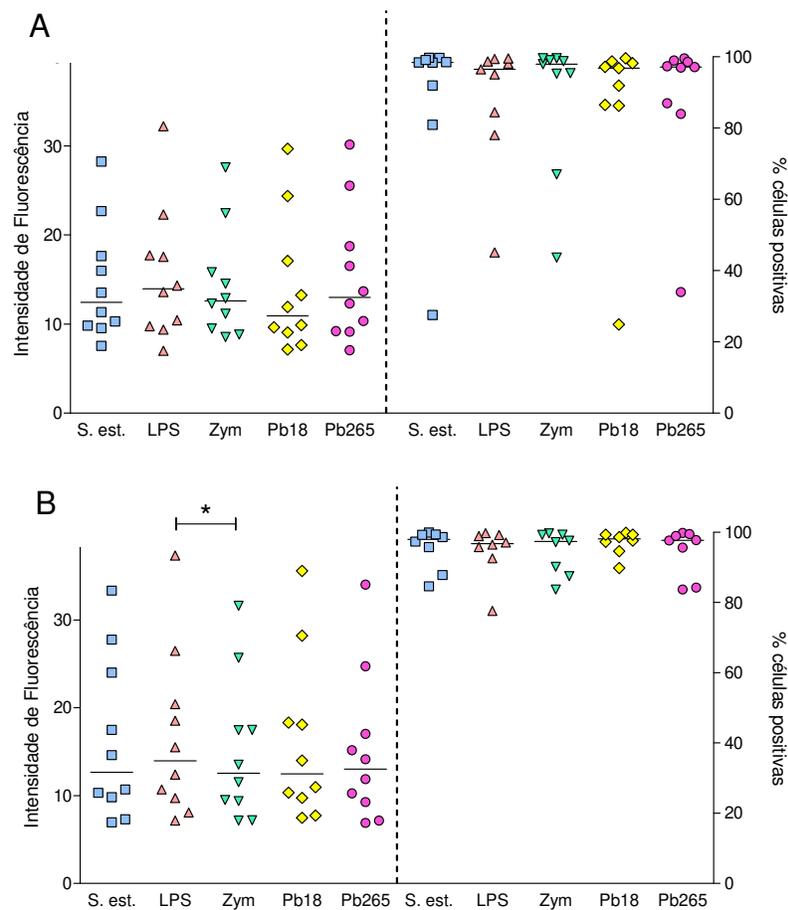


Figura 5 - Análise da expressão de TLR1 em neutrófilos não estimulados e estimulados por 30 minutos (A) ou 60 minutos (B) com LPS (1 μ g/mL), zimosan (zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon.

Assim como o TLR1, a análise da expressão de TLR2 demonstrou que a exposição às duas cepas de *P. brasiliensis* leva à diminuição da intensidade média de fluorescência para esse receptor após 30 minutos de estímulo, o mesmo acontecendo na presença de LPS ou zimosan (figura 6A – lado esquerdo). Após 60 minutos de estímulo, apesar de observarmos uma queda na expressão quando os monócitos foram expostos a células fúngicas, semelhante àquela observada para o zimosan (figura 6B – lado esquerdo), não houve diferenças estatísticas. Assim como ocorreu para o TLR1, a porcentagem de células positivas para TLR2 permaneceu constante nos dois tempos de incubação e foi independente do estímulo utilizado (figura 6 – lado direito), demonstrando a presença constante deste receptor na superfície celular.

As análises também mostraram que a intensidade de fluorescência observada para o TLR2 foi a mais alta encontrada entre os receptores do tipo Toll estudados, indicando ser o receptor do tipo Toll mais abundante na superfície de monócitos.

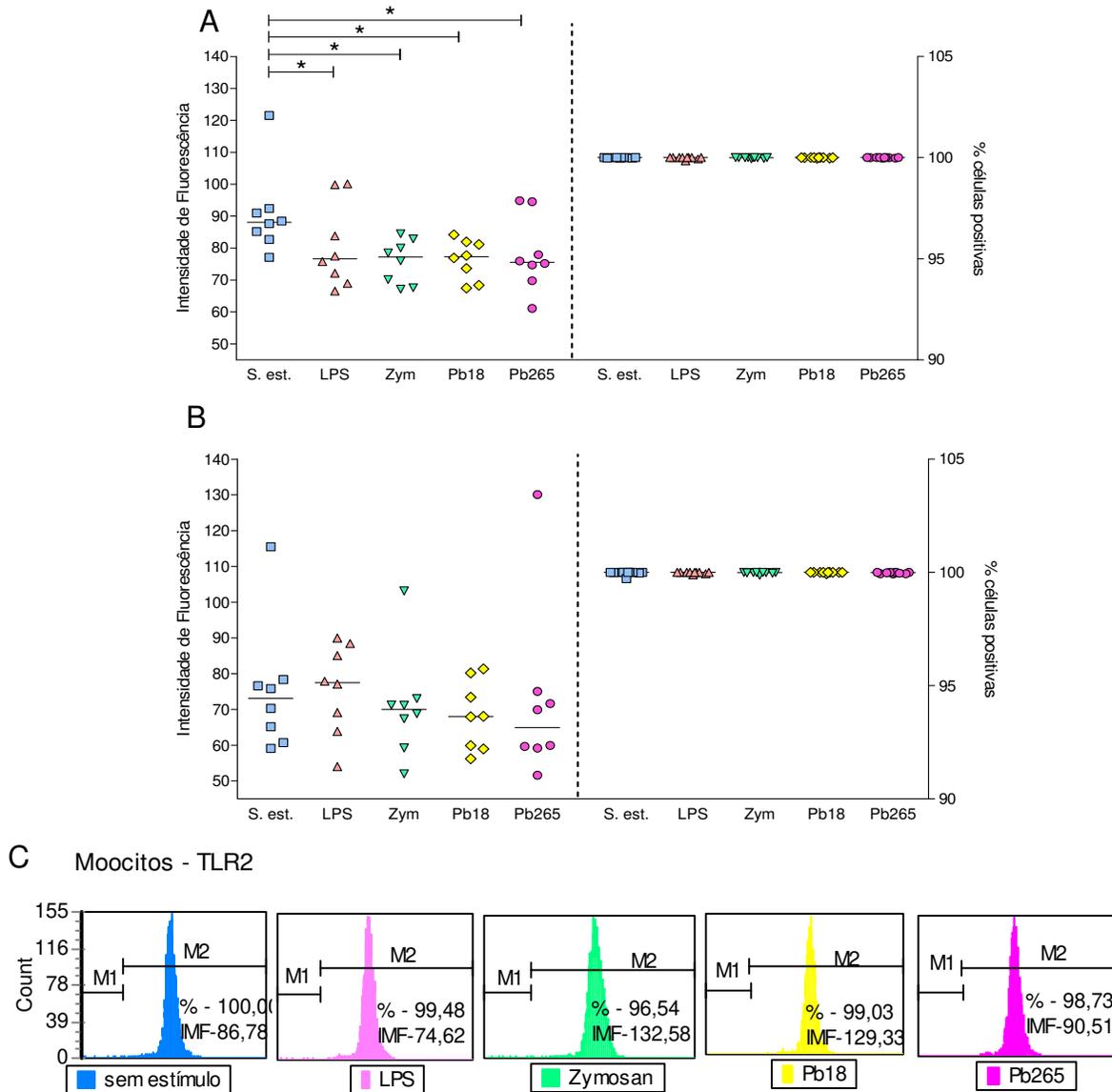


Figura 6 - Análise da expressão de TLR2 em monócitos não estimulados e estimulados por 30 minutos (**A** e **C**) ou 60 minutos (**B**) com LPS (1 μ g/mL), zimosan (zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon. **C**) Histogramas representativos da citometria de fluxo de monócitos (células CD14+) de um indivíduo, não estimulados ou estimulados com LPS, zimosan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 e Pb265).

A expressão de TLR2 em neutrófilos também se apresentou diminuída frente a todos os estímulos utilizados, após 30 minutos (figura 7A – lado esquerdo). As diferenças em relação às células não estimuladas ocorreram quando os neutrófilos foram estimulados com as células fúngicas de *P. brasiliensis* das duas cepas. Após 60 minutos, assim como para os monócitos, não foi possível observar diferenças estatísticas entre os estímulos (figura 7B), não havendo diferença também na porcentagem de células positivas em nenhum dos estímulos ou tempos de incubação analisados (figura 7 A e B – lado direito).

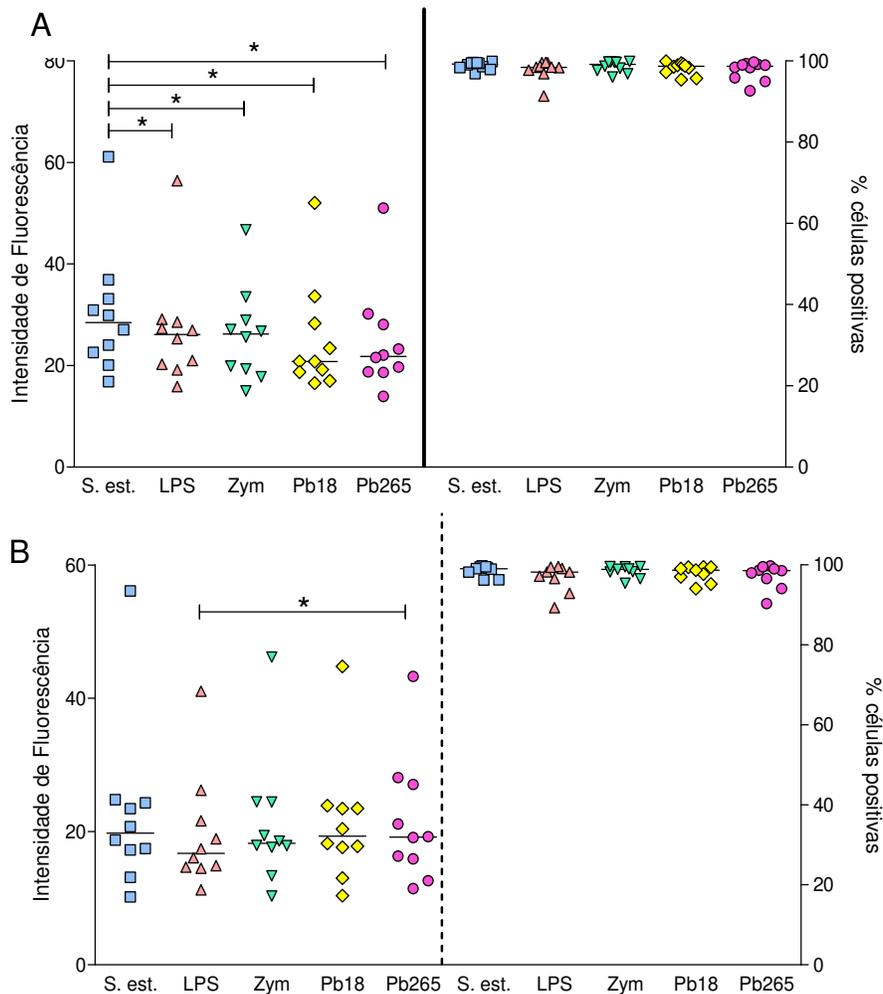
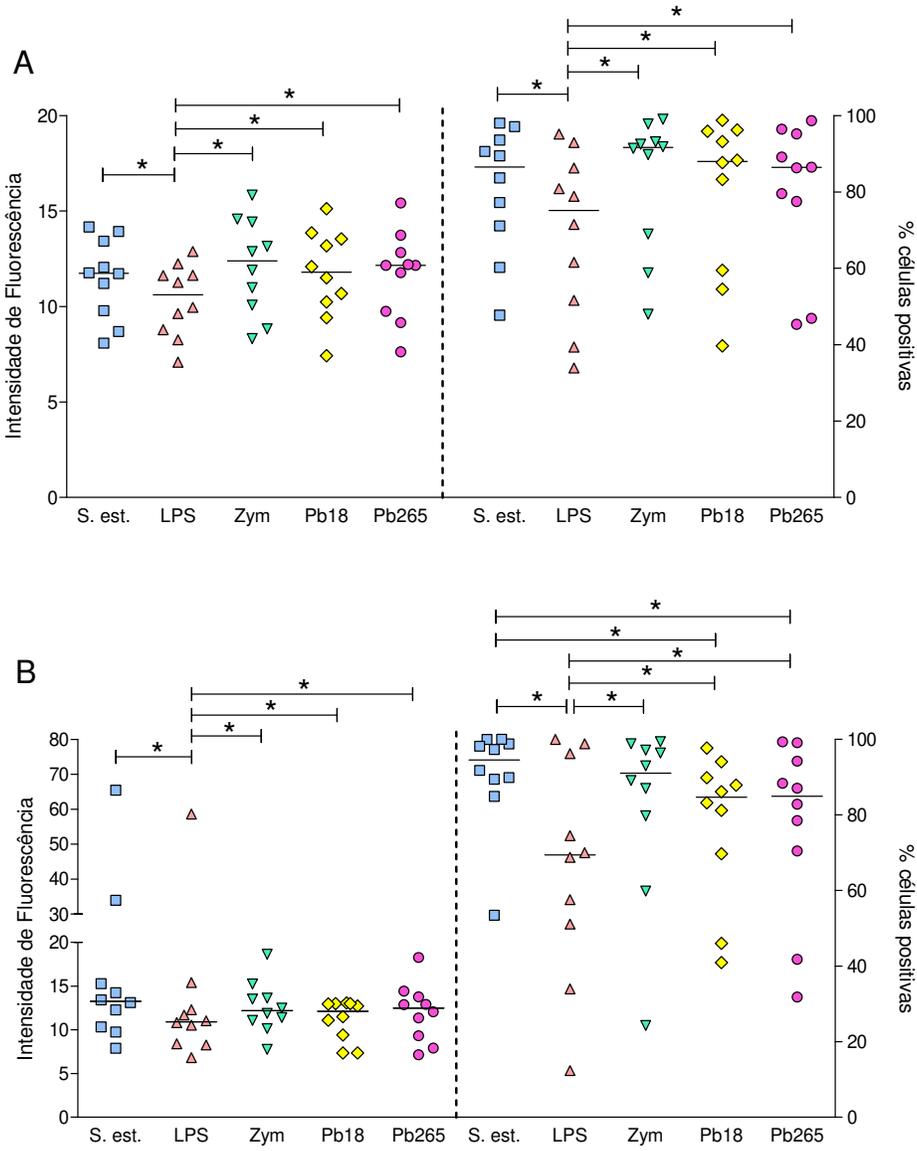


Figura 7 (página anterior) - Análise da expressão de TLR2 em neutrófilos não estimulados e estimulados por 30 minutos (A) ou 60 minutos (B) com LPS (1µg/mL), zimosan (zym) (10µg/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon.

A expressão de TLR-4 foi a mais variável dentre os receptores analisados, tanto em monócitos (figura 8) como em neutrófilos (figura 9). Nas culturas de monócitos estimulados por 30 minutos (figura 8A) só houve diminuição na expressão de TLR4 em células estimuladas com LPS, tanto em relação à intensidade de fluorescência (lado esquerdo), quanto em relação à porcentagem de células positivas (lado direito). Após 60 minutos de incubação, observamos que os monócitos estimulados com as duas cepas de *P. brasiliensis*, passaram também a apresentar diminuição na porcentagem de positividade (figura 8B – lado direito), em relação aos monócitos não estimulados e aos estimulados com zimosan, embora a estimulação com LPS tenha causado um efeito superior em relação a todos os outros estímulos.



C Monócitos - TLR4

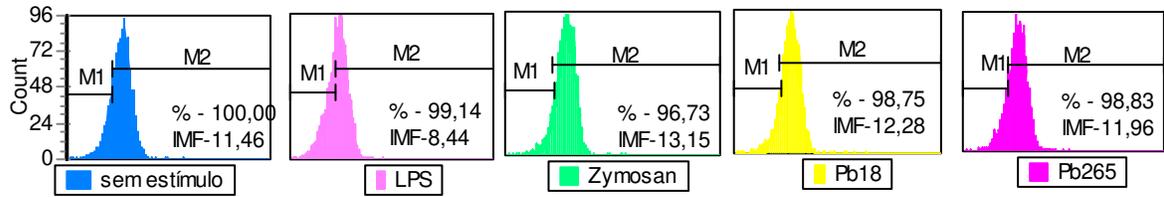


Figura 8 (página anterior) - Análise da expressão de TLR4 em monócitos não estimulados e estimulados por 30 minutos (**A** e **C**) ou 60 minutos (**B**) com LPS (1µg/mL), zimosan (zym) (10µg/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon. **C**) Histogramas representativos da citometria de fluxo de monócitos (células CD14+) de um indivíduo, não estimulados ou estimulados com LPS, zimosan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 e Pb265).

A expressão do TLR4 nos neutrófilos mostrou-se também bastante variável (figura 9). Assim como para os monócitos, o estímulo que teve maior impacto na expressão desse receptor foi o LPS, tanto após 30 (figura 9A), como 60 minutos de estimulação (figura 9B).

É interessante notar que somente nessa população foi observada diferença significativa na capacidade das células leveduriformes das diferentes cepas de *P. brasiliensis* em alterar a frequência de células TLR4⁺. De fato, com 30 minutos de estímulo, a frequência de neutrófilos TLR4⁺ foi menor após a estimulação com a cepa de baixa virulência (Pb265), do que após contato com a cepa de alta virulência (figura 9A, lado direito). Após 60 minutos esta diferença não foi mais observada, mantendo apenas a diferença em relação ao LPS (figura B, lado direito).

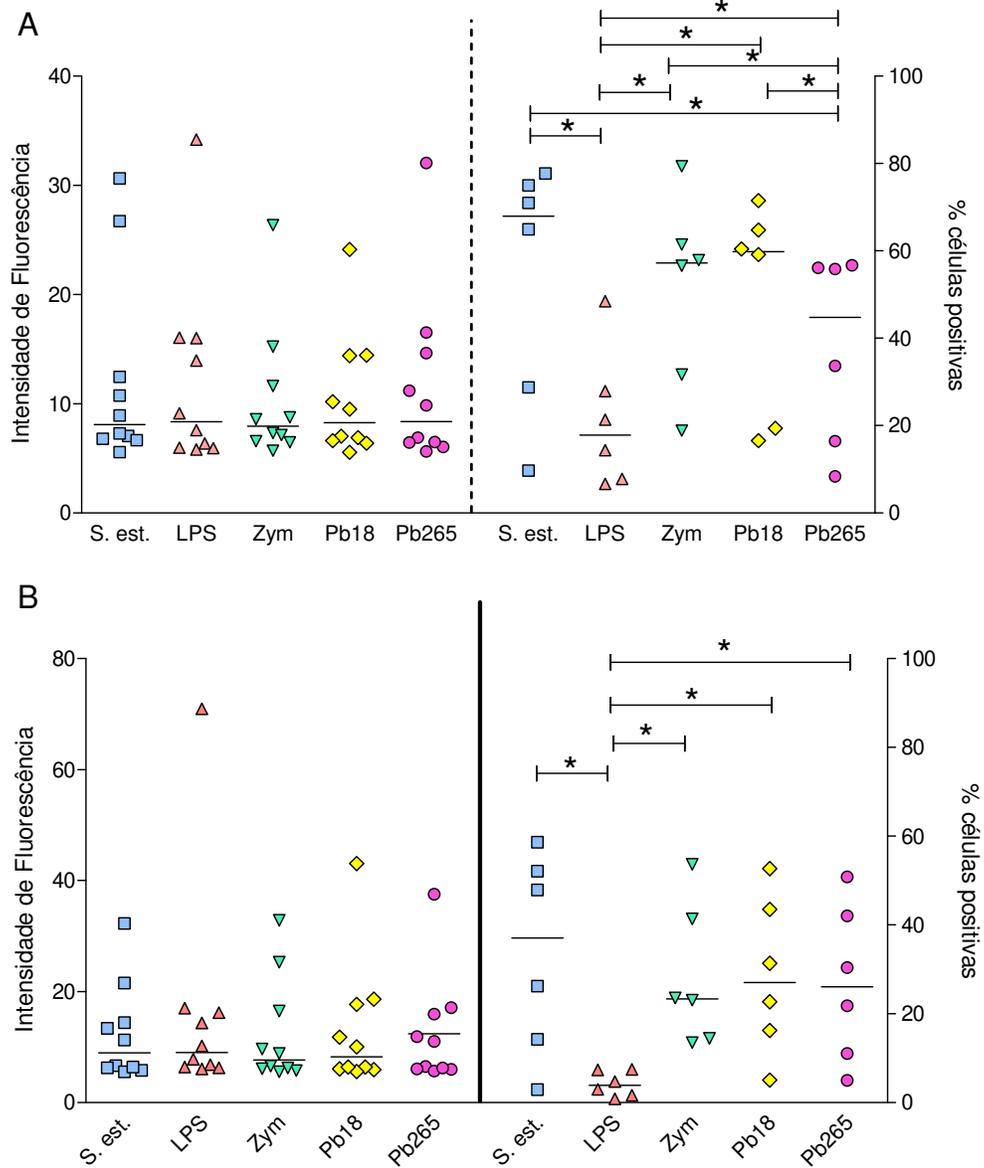


Figura 9 - Análise da expressão de TLR4 em neutrófilos não estimulados e estimulados por 30 minutos (A) ou 60 minutos (B) com LPS (1 μ g/mL), zimosan (zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon.

A expressão de dectina-1, receptor do tipo C-lectina capaz de reconhecer moléculas de β -glucanos, também se mostrou bastante variável nos monócitos. Verificamos diminuição significativa da presença deste receptor nos monócitos após estimulação com zimosan e em menor escala com leveduras de *P. brasiliensis*, já com 30 minutos de estimulação (figura 10A, lado esquerdo). Notamos também que a intensidade média de fluorescência das células estimuladas com a cepa de baixa virulência (Pb265) tende a diminuir mais acentuadamente que naquelas estimuladas com Pb18 (figura 10A, lado esquerdo). Com relação à porcentagem de células positivas para dectina-1, após 30 minutos de estimulação com ambas as cepas, não houve variação significativa em comparação com as células não estimuladas. Após 60 minutos a queda na expressão dectina-1 permaneceu na presença de zimosan e em menor escala com as leveduras de *P. brasiliensis* (figura 10B, lado esquerdo).

De modo geral, a intensidade média de fluorescência da dectina-1 foi maior em monócitos do que em neutrófilos, demonstrando a sua abundância na superfície destas células.

Comparando com os monócitos que não receberam estímulo, observamos que a porcentagem de células positivas para o receptor dectina-1 diminui logo após 30 minutos de estimulação apenas com o zimosan (figura 10-A, lado direito). Após uma hora de estimulação, também verificamos diferença significativa na porcentagem de células positivas que foram cultivadas na presença da cepa de baixa virulência (figura 10B, lado direito). Este fato pode estar relacionado com a

maior exposição de β -glucanos na parede do fungo da cepa de baixa virulência em relação à cepa de alta virulência, tornando-o assim a cepa Pb265 mais fácil de ser reconhecido pelas células do sistema imune inato.

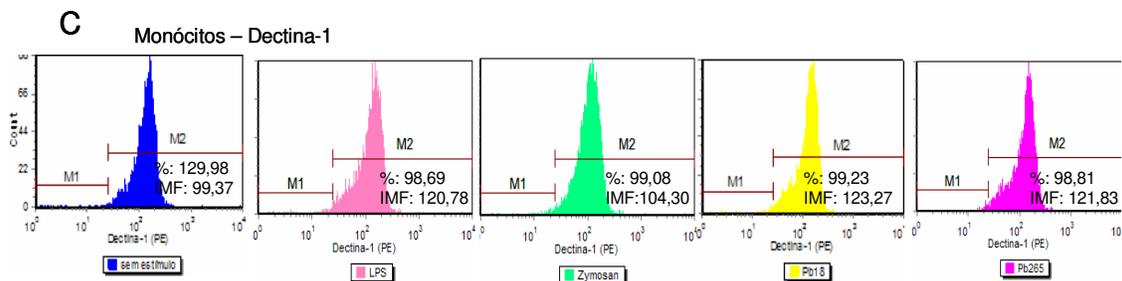
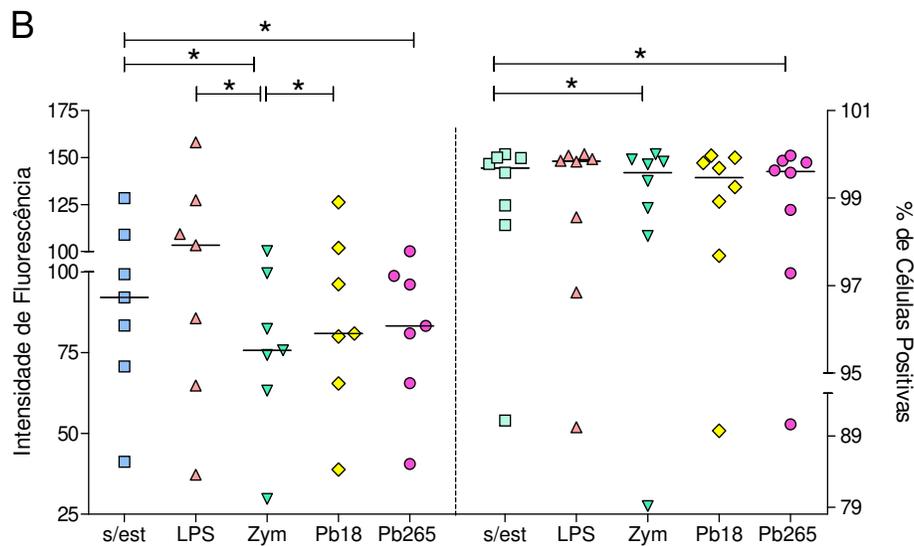
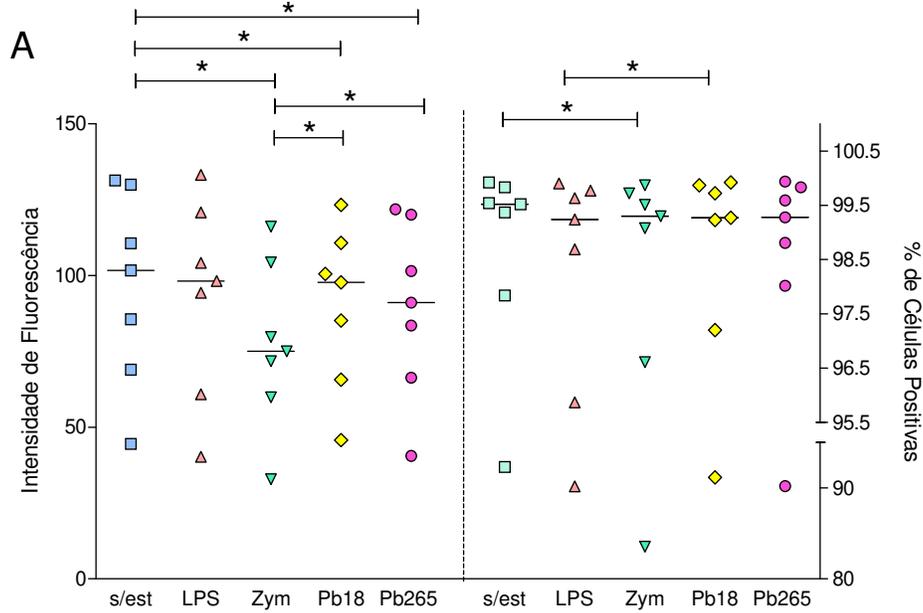


Figura 10 (página anterior) - Análise da expressão de dectina-1 em monócitos não estimulados e estimulados por 30 minutos (**A** e **C**) ou 60 minutos (**B**) com LPS (1µg/mL), zimosan (zym) (10µg/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon. **C**) Histogramas representativos da citometria de fluxo de monócitos (células CD14+) de um indivíduo, não estimulados ou estimulados com LPS, zimosan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 e Pb265).

Assim como os monócitos, os neutrófilos também apresentaram grande variação na expressão de dectina-1. Pudemos observar que houve diminuição significativa deste receptor em células estimuladas com zimosan e com leveduras da cepa Pb265 logo após 30 minutos (figura 11 – A, lado esquerdo). No entanto, após uma hora de estimulação, não verificamos diferença de expressão com a estimulação por Pb265 (figura 11 – B, lado esquerdo).

Observamos diminuição significativa na porcentagem de neutrófilos positivos para a dectina-1 após estimulação com ambas as cepas do fungo por 30 minutos (figura 11 – A, lado direito), enquanto que com 60 minutos de estímulo, houve apenas uma tendência de diminuição na porcentagem de células positivas estimuladas com a cepa Pb265 (figura 11 – B, lado direito). O LPS foi o estímulo que induziu maior diminuição da frequência de neutrófilos positivos para a dectina-1 nos dois períodos de estimulação estudados (figura 11A e B, lado direito).

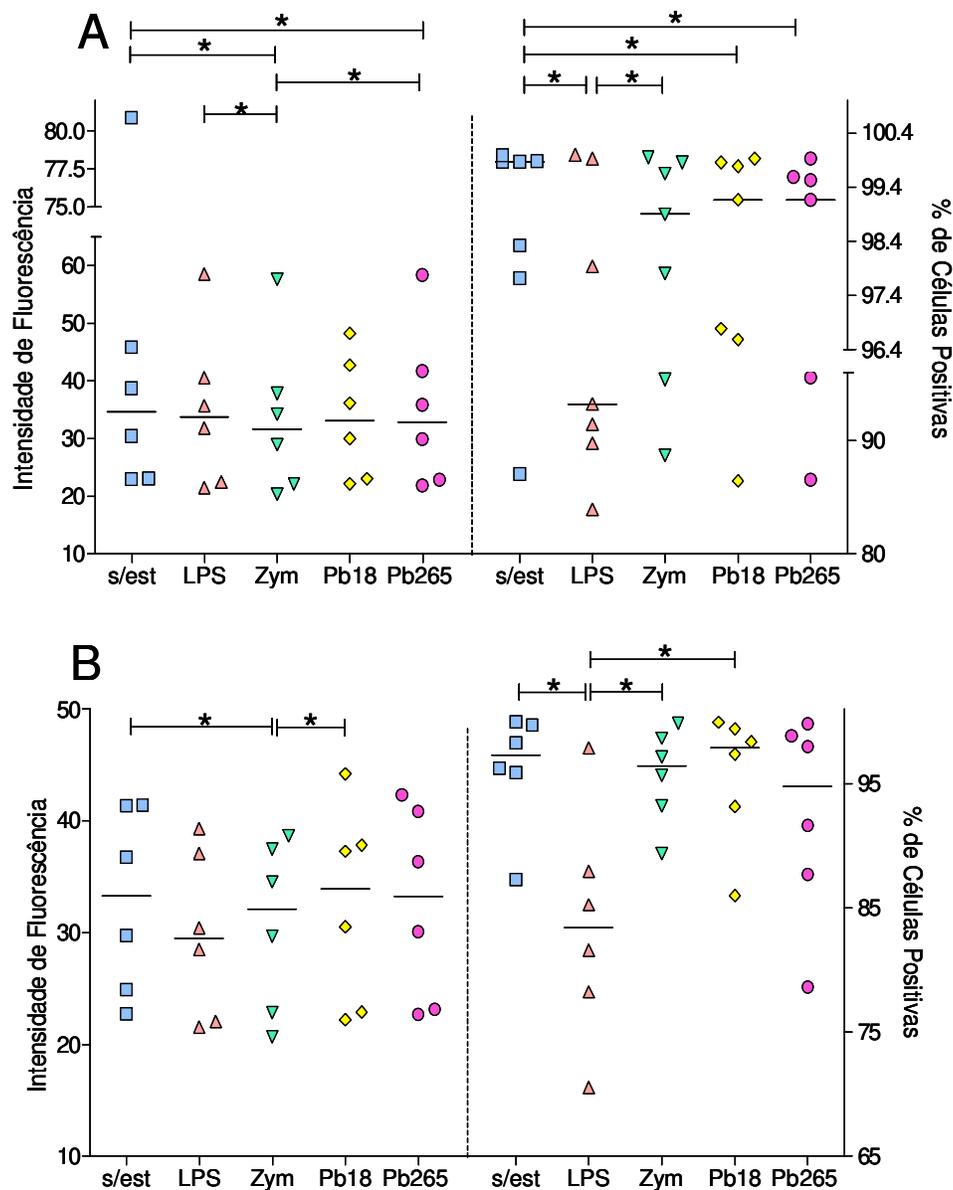
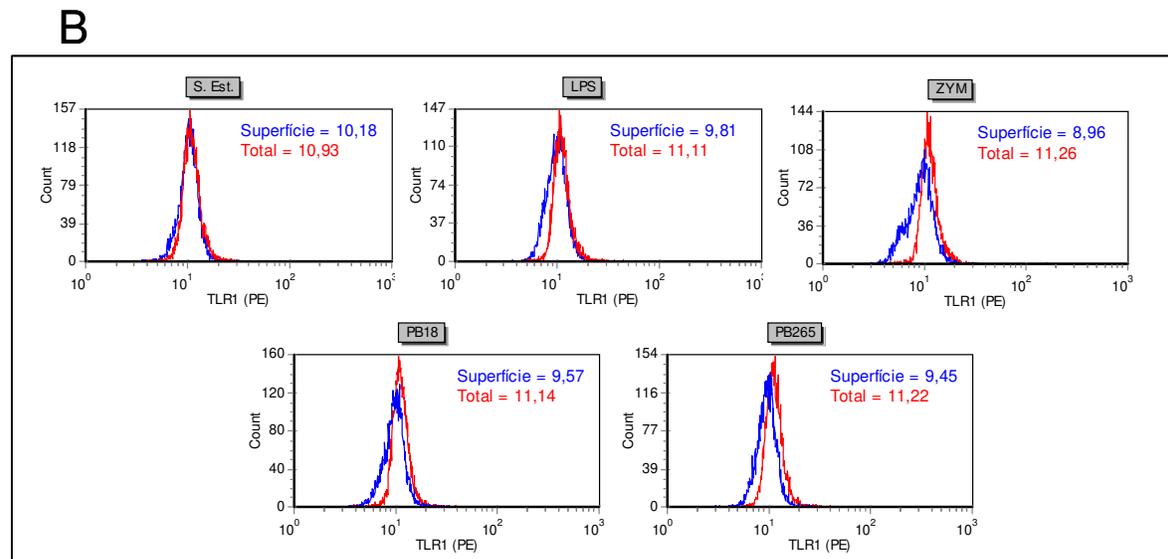
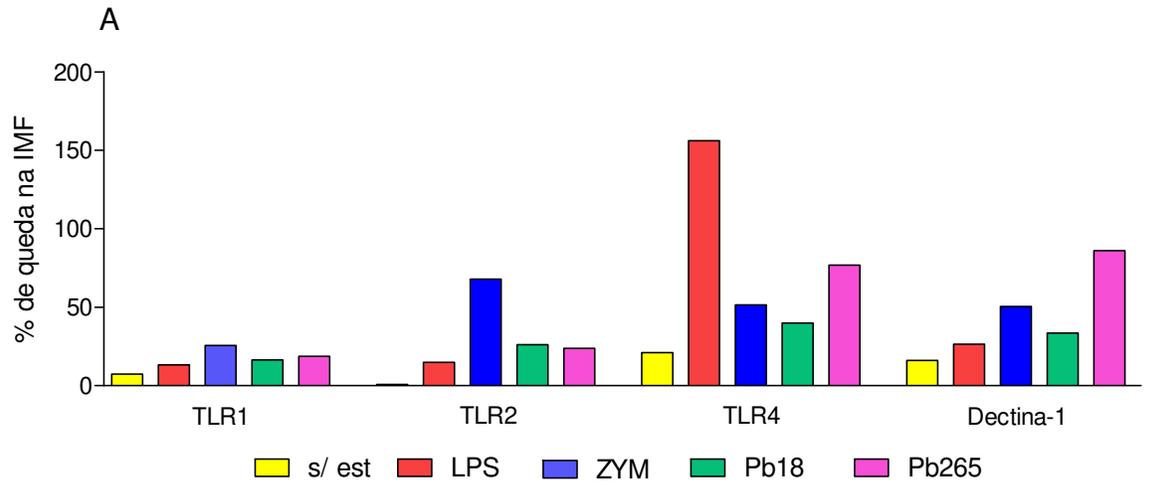


Figura 11 - Análise da expressão de dectina-1 em neutrófilos não estimulados e estimulados por 30 minutos (A) ou 60 minutos (B) com LPS (1 μ g/mL), zimosan (zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Lado esquerdo – intensidade média de fluorescência; lado direito – porcentagem de células positivas. * $p < 0,05$, teste estatístico de Wilcoxon.

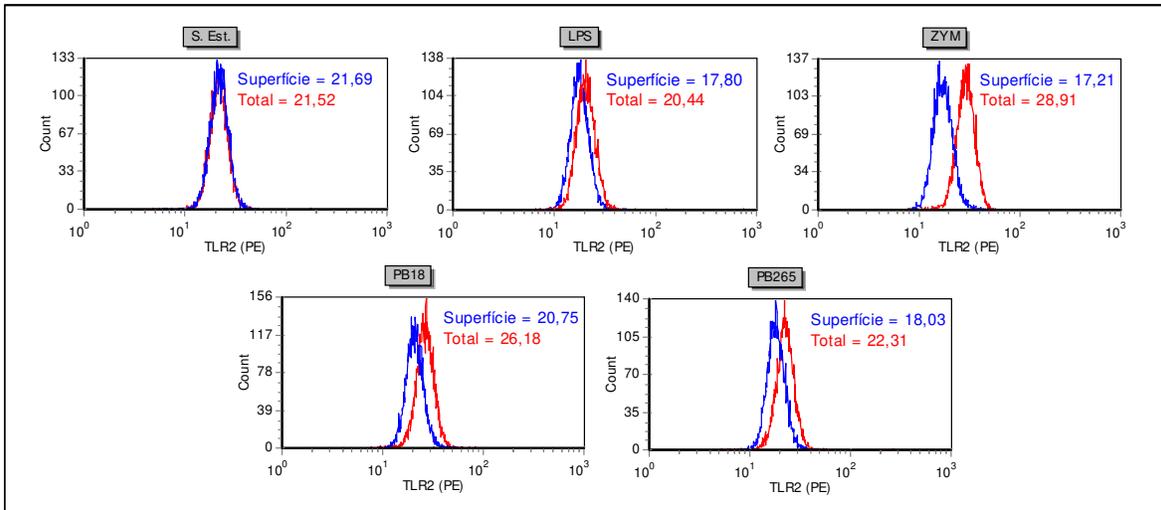
O fato de termos observado a diminuição da expressão de todos os receptores após o uso de estímulos específicos e das leveduras das duas cepas de *P. brasiliensis*, poderia indicar que após a ligação ocorre a internalização das moléculas, conforme descrito por Ozment-Skelton et al. (2006). Para comprovar essa hipótese realizamos experimentos nos quais verificamos a expressão dos receptores somente na superfície ou na superfície e no compartimento intracelular (total). Para tal, células de dois doadores foram estimuladas nas mesmas condições descritas, e coletadas após 30 minutos. As células foram então separadas em dois tubos e foi realizada a marcação de superfície conforme descrito em materiais e métodos. Após a fixação em um dos tubos foi realizada também a marcação intracelular adicionando-se os mesmos anticorpos e reagentes secundários, após a permeabilização das células (saponina 0,5% por 10 minutos).

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 12 A-E), os resultados indicam que, dependendo do estímulo, realmente ocorre a internalização dos receptores, visto que há uma queda na intensidade média de fluorescência e um aumento na IMF total (marcação superficial adicionada a marcação intracelular). Nas células não estimuladas praticamente não há diferença entre a expressão de superfície e total. Contudo, é evidente a internalização do TLR-2 (figura 12-B) nas células que foram estimuladas por zimosan e pelas células fúngicas. Já para o TLR-4, a maior diferença foi encontrada nas células que receberam LPS, mas também a estimulação com leveduras da cepa Pb265 parece acarretar aumento da internalização desta molécula (figura 12C). A cepa Pb265 também levou a

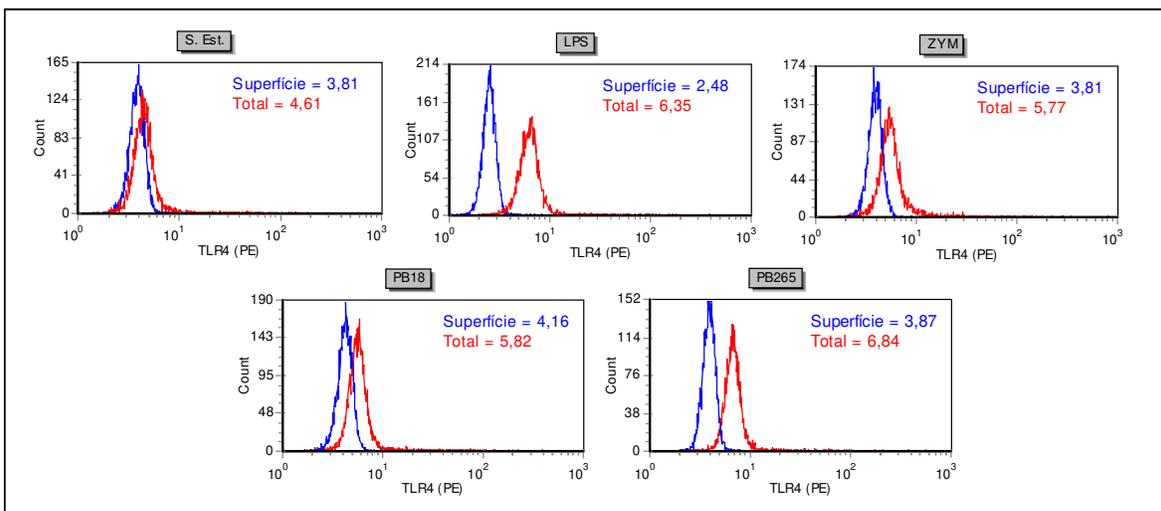
maior diferença quanto a internalização de dectina-1 (figura 12D), seguida pela estimulação com zimosan e com a cepa Pb18.



C



D



E

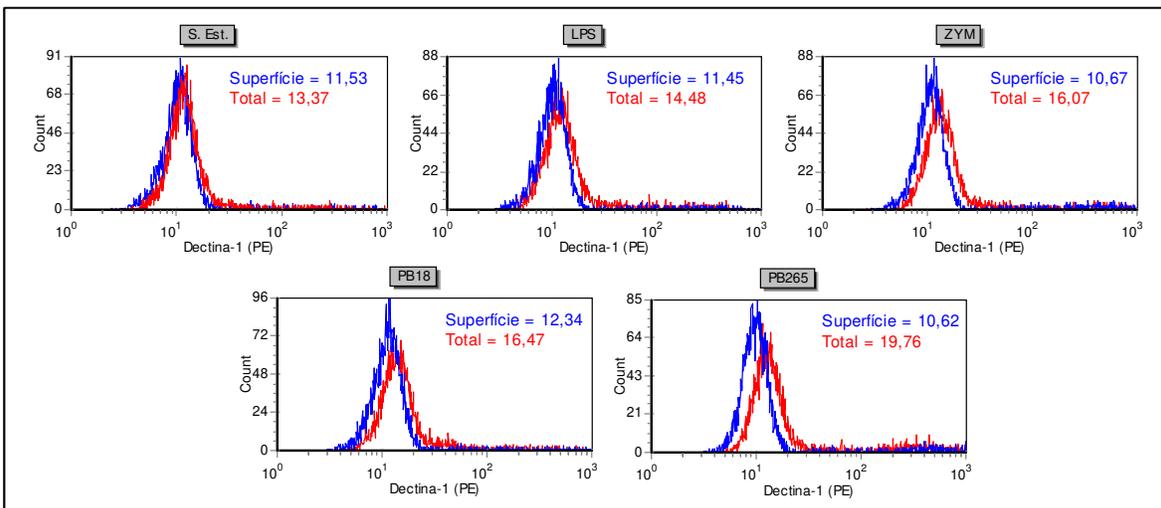


Figura 12 (páginas anteriores) – Comparação entre marcação total (intracelular e extracelular) e marcação de superfície (somente extracelular), para receptores da resposta imune inata, em monócitos estimulados por 30 minutos. **(A)** Porcentagem de queda na intensidade média de fluorescência observada na marcação de superfície, em relação à marcação total (superfície mais intracelular). **(B-E)** Histogramas representativos dos experimentos realizados para a avaliação da presença de receptores (TLR1 – **B**; TLR2 – **C**, TLR4 – **D** e dectina-1 – **E**) na superfície das células e na superfície mais intracelular (total) após estímulos com LPS, zimosan (Zym) e ambas as cepas de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265). Os estímulos utilizados estão destacados em cada histograma. Os números em cada figura representam a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada um dos receptores (a linha azul representa a marcação de superfície e a linha vermelha representa a marcação total: superfície + intracelular).

2. Análise da expressão do RNAm de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em monócitos e neutrófilos por Q-RT-PCR .

Na segunda parte do trabalho, analisamos a expressão de RNAm para as moléculas de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 em monócitos e neutrófilos pela técnica de PCR em tempo real (Q-RT-PCR). Devido à quantidade insuficiente de células que obtivemos para realização de extração de RNA de boa qualidade, optamos por realizar inicialmente um experimento onde testamos a influência dos estímulos controles (LPS e Zimosan) nas células estudadas, para então analisarmos o efeito da estimulação com células fúngicas.

Na figura 13 podemos verificar os resultados obtidos com a estimulação de monócitos com LPS e zimosan por 15 e 60 minutos. O LPS foi o estímulo que promoveu maior expressão de TLR-1 (figura 13-A) e TLR-4 (figura 13-C), enquanto que o zimosan interferiu mais na expressão de TLR-2 (figura 13-B) e dectina-1 (figura 13-D).

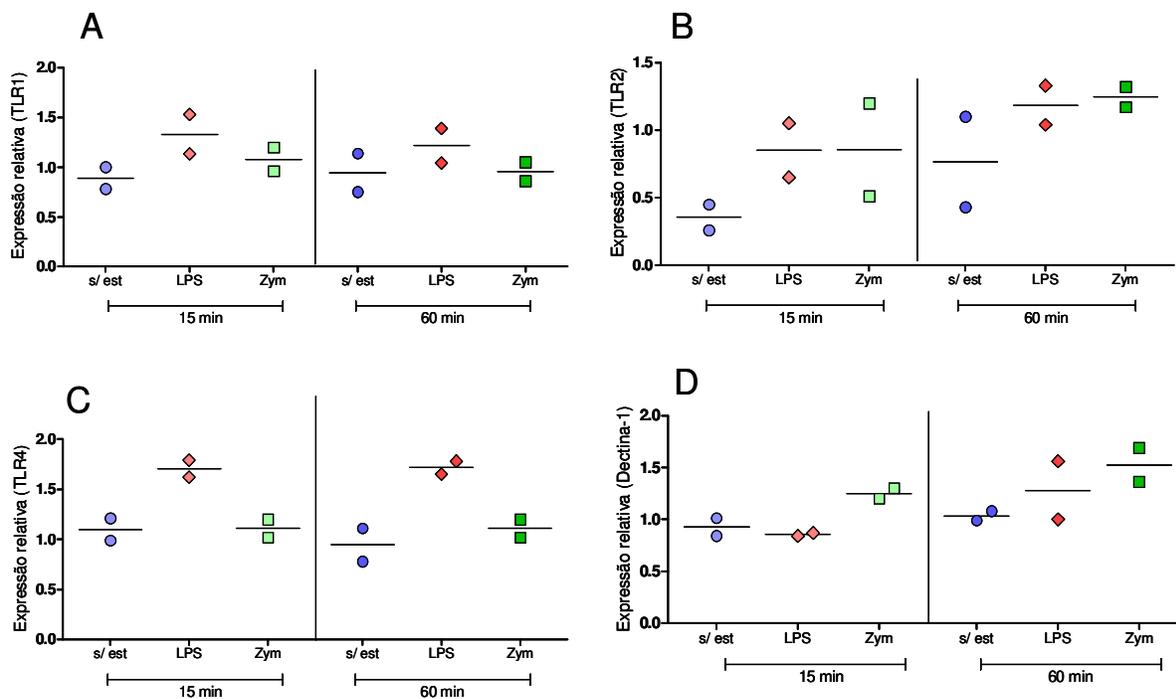


Figura 13 - Análise da expressão relativa do RNAm para TLR-1 (A), TLR-2 (B), TLR-4 (C) e dectina-1 (D) em monócitos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com LPS (1 μ g/mL) e zimosan (Zym) (10 μ g/mL). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra, conforme descrito em materias e métodos.

Com base nas análises dos controles positivos, realizamos culturas de monócitos na presença das cepas de alta virulência (Pb18) e baixa virulência (Pb265) de *P. brasiliensis* por 15 e 60 minutos. Como pode ser observado na figura 14, não houve alteração significativa na expressão do TLR-1 após o estímulo com as células fúngicas.

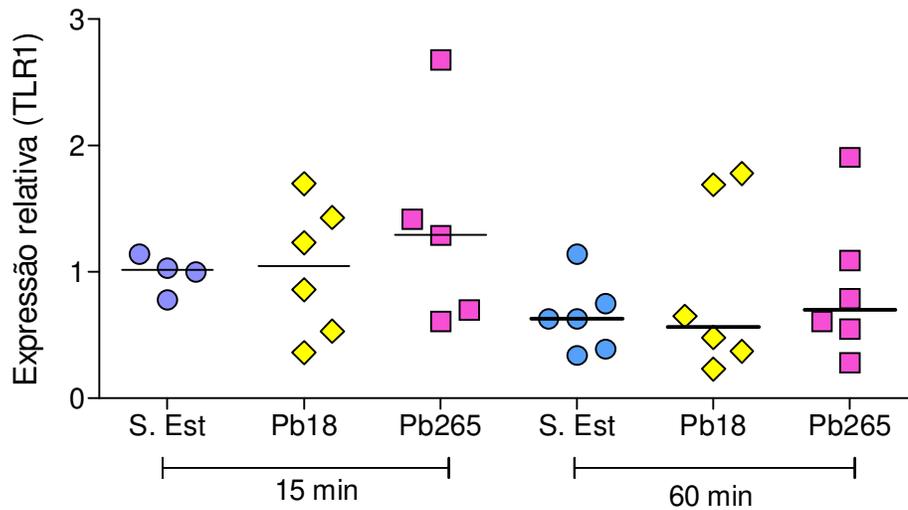


Figura 14 - Análise da expressão do RNAm para TLR-1 em monócitos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra. Teste estatístico de Kruskal-Wallis

Em relação ao TLR2, apesar de não havermos observado diferenças significativas na expressão do RNAm, os resultados sugerem uma tendência a um maior aumento de expressão induzida pelas leveduras após 15 minutos de estimulação (figura 15). Contudo, após 60 minutos não observamos diferenças significativas na expressão de TLR-2.

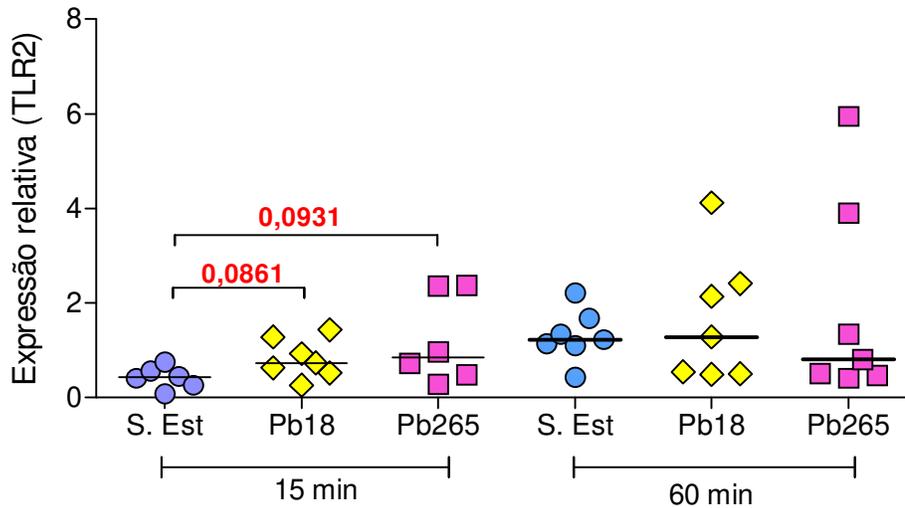


Figura 15 - Análise da expressão do RNAm para TLR-2 em monócitos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm para GAPDH e ubiquitina em cada amostra. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Assim como para o TLR-1, o TLR-4 também não apresentou variação de sua expressão em monócitos estimulados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* em nenhum dos períodos analisados (figura 16).

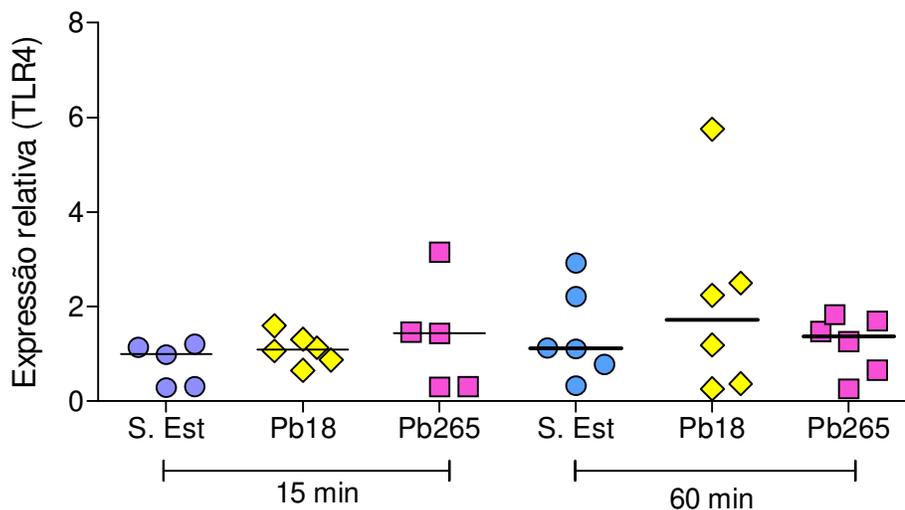


Figura 16 (pagina anterior) - Análise da expressão do RNAm para TLR-4 em monócitos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm para GAPDH e ubiquitina em cada amostra.

A expressão relativa do RNAm de dectina-1 foi significativamente maior em monócitos estimulados por 15 minutos com leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb265 (figura 17), havendo também uma tendência de aumento com o estímulo proporcionado pela cepa Pb18. Após 60 minutos de estimulação, ambas as cepas induziram um aumento significativo na expressão da dectina-1 (figura 17).

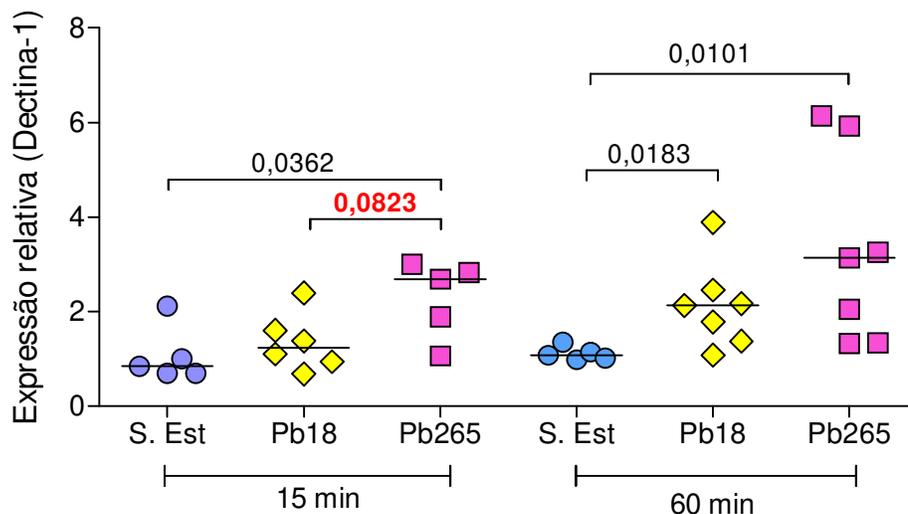


Figura 17 - Análise da expressão do RNAm para dectina-1 em monócitos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm para GAPDH e ubiquitina em cada amostra. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Assim como demonstrado para os monócitos, a expressão do RNAm para TLR-1 em neutrófilos variou, independente do estímulo (figura 18).

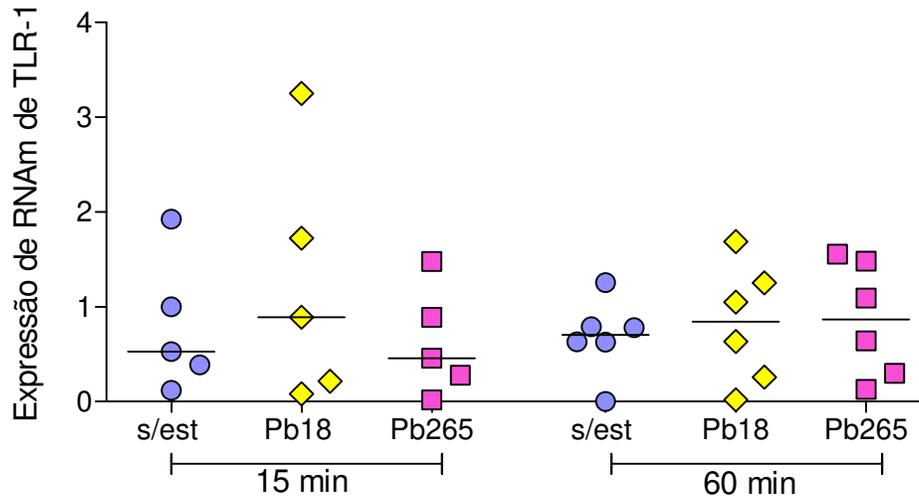


Figura 18 - Análise da expressão do RNAm para TLR-1 em neutrófilos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra. $p < 0,05$, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Por outro lado, a expressão do receptor TLR-2 em neutrófilos pareceu sofrer mais influência da cepa Pb265 após 15 minutos de estimulação, embora a diferença em relação à condição sem estímulo não tenha sido estatisticamente significativa. Com o aumento do período de cultura esta tendência se confirma, havendo um aumento significativo da expressão do RNAm para TLR-2 nas células estimuladas com a cepa Pb265. Também notamos uma tendência no aumento da expressão deste receptor em células estimuladas com a cepa Pb18 (figura 19).

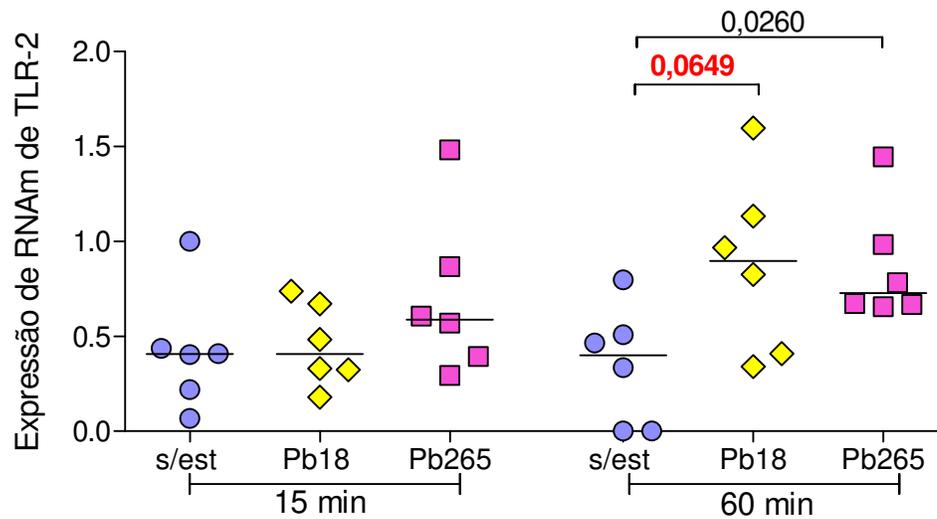


Figura 19 - Análise da expressão do RNAm para TLR-2 em neutrófilos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm para GAPDH e ubiquitina em cada amostra. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Leveduras da cepa Pb18 estimularam de forma importante a expressão do TLR-4 em neutrófilos após 60 minutos em cultura a condição de sem estímulo (figura 20). Entretanto, os níveis de expressão do TLR-4 se mantiveram inalterados quando os neutrófilos foram estimulados com a cepa Pb265.

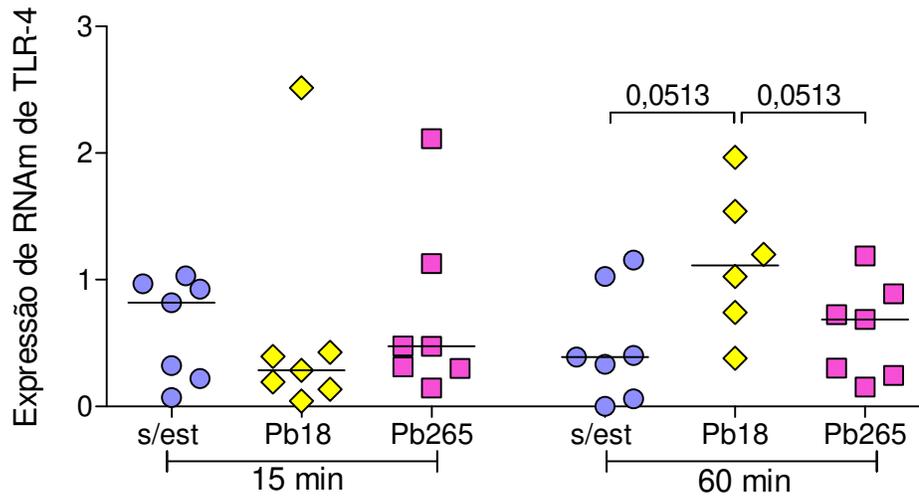


Figura 20 - Análise da expressão do RNAm para TLR-4 em neutrófilos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Leveduras da cepa Pb265 influenciam de forma mais evidente a expressão do RNAm de dectina-1. Na figura 21 pode-se notar que já após 15 minutos de cultivo, os neutrófilos aumentam a expressão de dectina-1 quando estimulados com leveduras da cepa Pb265. Contudo, prolongando o período de estimulação, não encontramos diferenças na expressão desse receptor para nenhum dos estímulos testados.

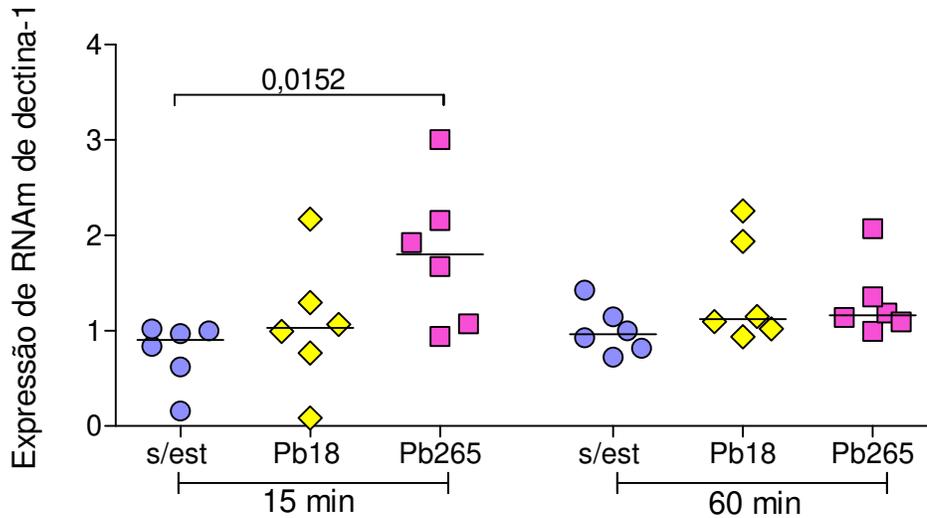


Figura 21 - Análise da expressão do RNAm para dectina-1 em neutrófilos de doadores normais não estimulados ou estimulados por 15 minutos ou 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra. Os valores de p estão indicados sobre os colchetes, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

3. Análise da expressão do RNAm para TNF- α , IL-10 e TGF- β em monócitos por Q-RT-PCR .

Com o intuito de analisar o possível efeito das células leveduriformes de *P. brasiliensis* sobre a produção de citocinas, analisamos a expressão de RNAm das citocinas TNF- α , IL-10 e TGF- β em células estimuladas em cultura durante 60 minutos.

Os resultados indicam uma tendência da cepa Pb18 em estimular a expressão do RNAm para TNF- α (figura 22-A) e TGF- β (figura 22-B). Entretanto,

para a cepa Pb265 não encontramos um aumento significativo da expressão destas citocinas.

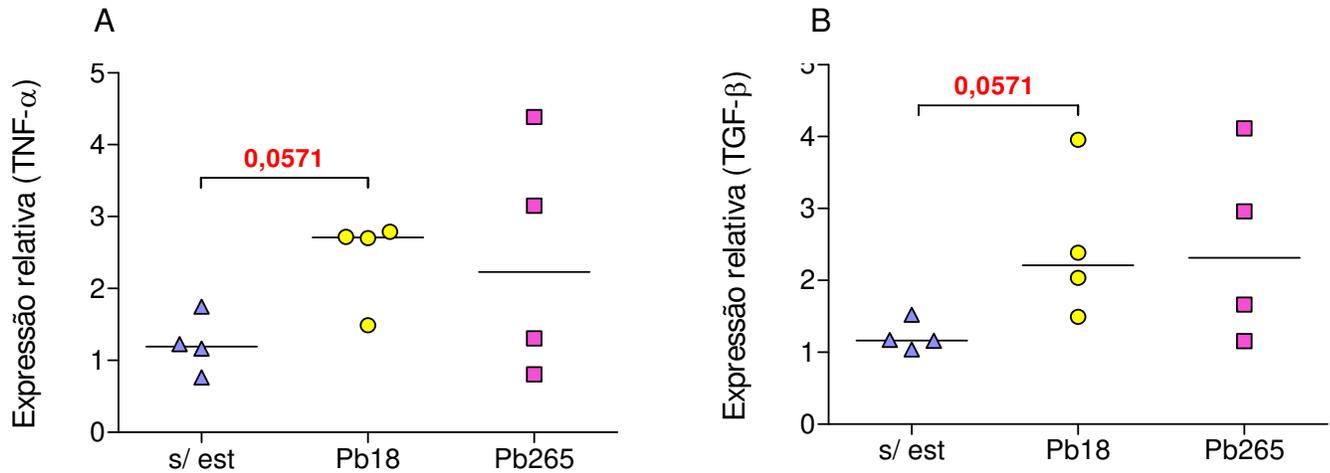


Figura 22 - Análise da expressão do RNAm de TNF- α (A) e TGF- β (B) em monócitos doadores normais não estimulados ou estimulados por 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra. $p < 0,05$, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Verificamos um aumento significativo da expressão RNAm para IL-10, quando monócitos foram estimulados pela cepa de alta virulência (Pb18), enquanto que para a cepa Pb265 houve apenas uma tendência no aumento de sua expressão (figura 23).

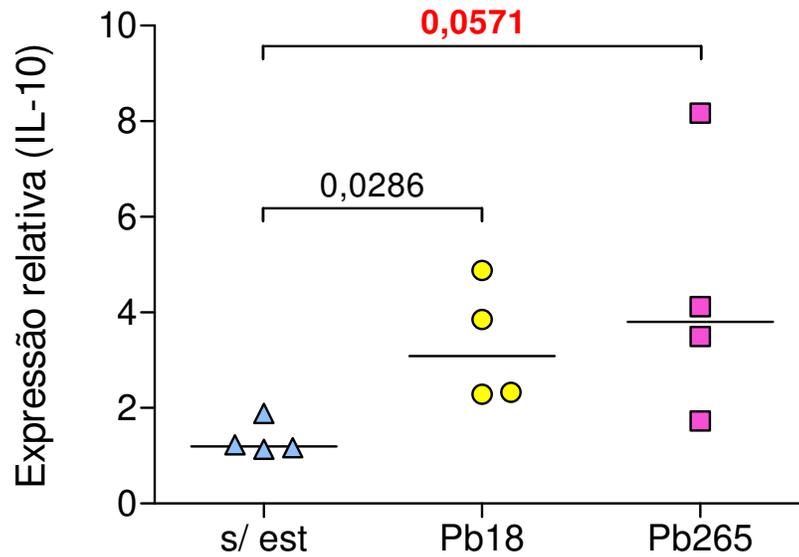


Figura 23 - Análise da expressão do RNAm de IL-10 em monócitos doadores normais não estimulados ou estimulados por 60 minutos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores foram normalizados de acordo com a quantidade de RNAm de GAPDH e ubiquitina em cada amostra. $p < 0,05$, teste estatístico de Kruskal-Wallis.

4. Análise da produção de TNF- α , IL-10 e prostaglandina E₂ (PGE₂) em sobrenadante de cultura através da técnica de ELISA.

Para comprovar a ativação dos monócitos e neutrófilos nas diferentes condições experimentais testadas, verificamos a produção de TNF- α , IL-10 e PGE₂ em sobrenadantes de 4 e 24 horas de cultura monócitos e neutrófilos de doadores normais estimulados por LPS, zimosan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* das cepas Pb18 e Pb265 por ELISA.

Nos sobrenadantes de culturas de neutrófilos (4 e 24 horas) e de monócitos (4 horas) não foi possível detectar IL-10 e TNF- α (dados não mostrados). Dessa forma os dados apresentados referem-se apenas as culturas de 24 horas de monócitos (IL-10, TNF- α e PGE₂) e neutrófilos (PGE₂).

A análise dos sobrenadantes mostrou que houve aumento da produção de TNF- α quando as células foram estimuladas com LPS, zimosan e com a cepa de alta virulência (Pb18), havendo uma tendência de maior produção com a cepa de baixa virulência (Pb265) (figura 24).

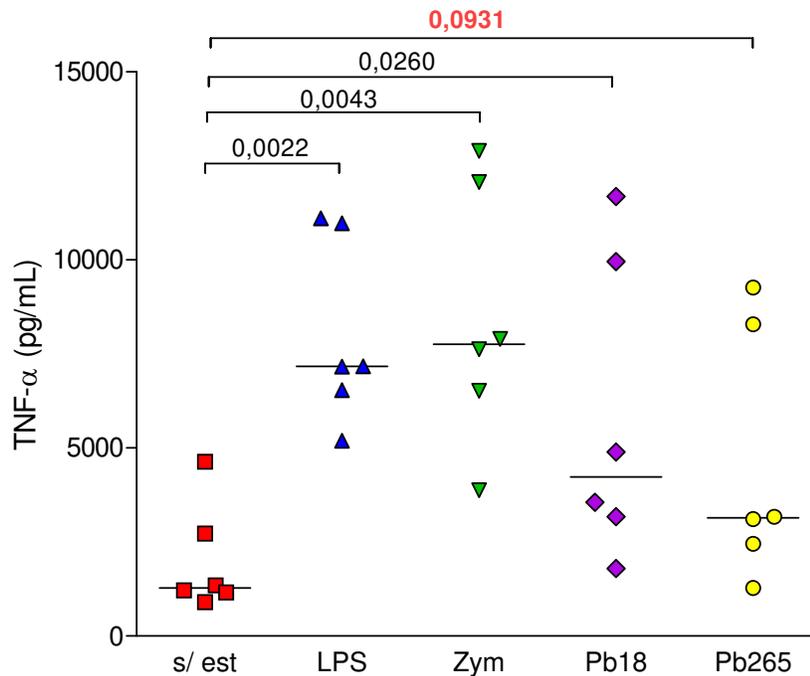


Figura 24 - Análise da produção de TNF- α em sobrenadantes de culturas de monócitos não estimulados ou estimulados por 24 horas com LPS (1 μ g/mL), zimosan (Zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores de p estão destacados sobre os colchetes. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Como podemos observar na figura 25, o estímulo com zimosan foi o que induziu maior produção de IL-10, seguido do LPS, tanto em relação às células não estimuladas, como em relação aos estímulos com ambas as cepas de *P. brasiliensis*.

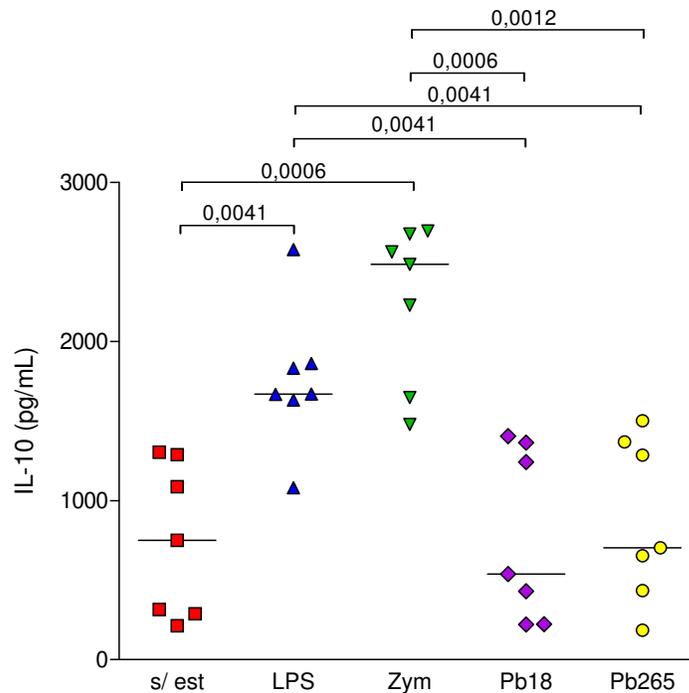


Figura 25 - Análise da produção de IL-10 em sobrenadantes de culturas de monócitos não estimulados ou estimulados por 24 horas com LPS (1 μ g/mL), zimosan (Zym) (10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores de p estão destacados sobre os colchetes. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Quando analisamos a razão entre as concentrações de TNF- α e IL-10 frente aos diferentes estímulos (TNF- α /IL-10), pudemos observar que a estimulação com zimosan e Pb265 provoca uma produção preferencial de IL-10,

enquanto que o estímulo com a cepa de alta virulência Pb18 induz uma maior produção de TNF- α (figura 26).

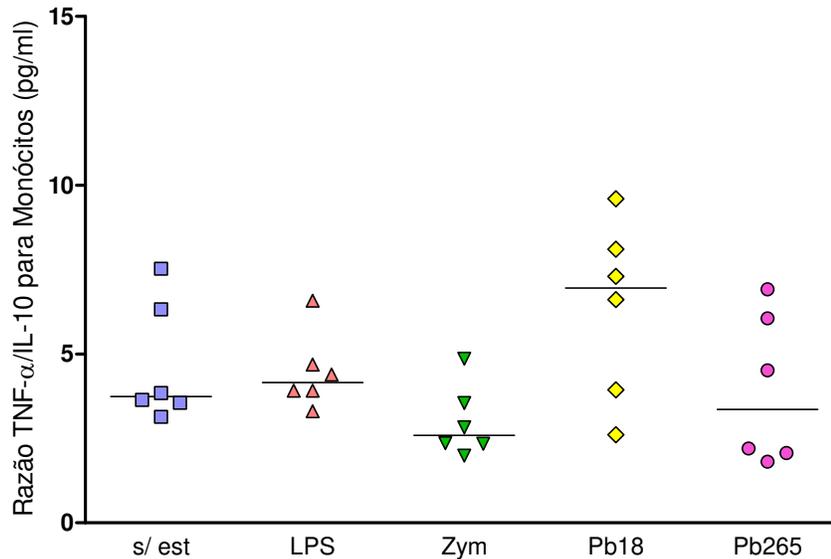


Figura 26 – Razão entre as quantidades de TNF- α e IL-10 (TNF- α /IL-10) em sobrenadantes de cultura de monócitos não estimulados ou estimulados por 24 horas com LPS (1 μ g/mL), zimosan (Zym - 10 μ g/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50).

A produção de PGE₂ foi analisada no sobrenadante de cultura de 24 horas de monócitos e neutrófilos.

Em relação aos monócitos, ocorreu um aumento significativo de PGE₂ na presença de LPS e de leveduras Pb265 e uma tendência a maior produção quando as células foram estimuladas com a cepa Pb18 (figura 27).

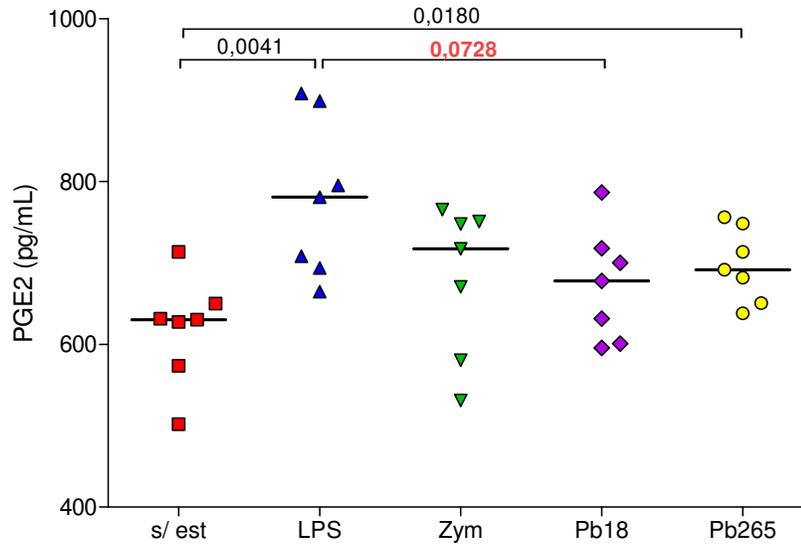


Figura 27 – Análise da produção de PGE₂ em sobrenadantes de culturas de monócitos não estimulados ou estimulados por 24 horas com LPS (1µg/mL), zimosan (Zym) (10µg/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores de p estão destacados sobre os colchetes. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Nas culturas de neutrófilos houve um aumento significativo na concentração de PGE₂ com todos os estímulos, embora em níveis 10 vezes menores do que aqueles produzidos por monócitos (figura 28).

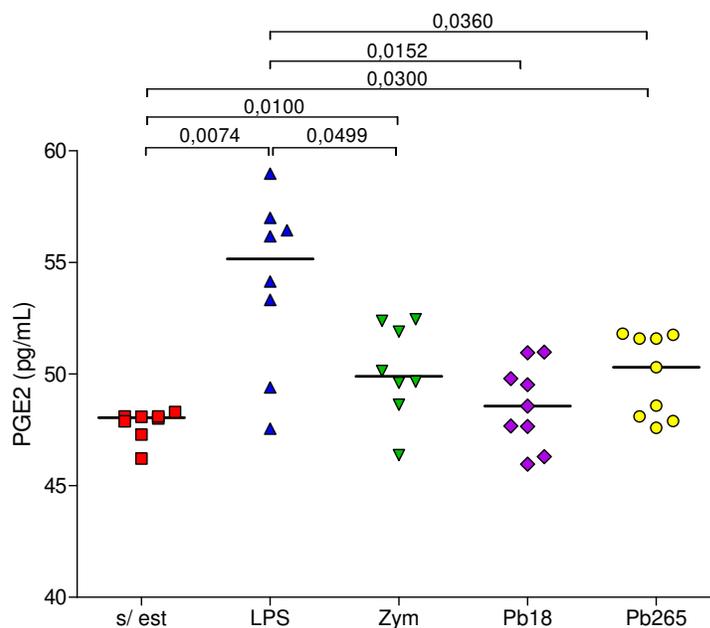


Figura 28 – Análise da produção de PGE₂ em sobrenadantes de neutrófilos não estimulados ou estimulados por 24 horas com LPS (1µg/mL), zimosan (Zym) (10µg/mL) e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265, proporção 1:50). Os valores de p estão destacados sobre os colchetes. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

O sistema imunológico dos vertebrados é formado por dois componentes principais, a resposta inata e a adaptativa, que são ativadas em conjunto com o objetivo de destruir agentes intra e extracelulares como vírus, fungos, bactérias e parasitas. Até recentemente estas duas categorias de resposta eram tratadas de forma independente. Entretanto, a descoberta de novas moléculas envolvidas no reconhecimento de patógenos por células da imunidade inata permitiu verificar a repercussão desse processo também no controle dos mecanismos essenciais que induzem e regulam a resposta adaptativa.

Dentre as moléculas da resposta imune inata envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), o nosso trabalho teve por objetivo verificar a participação dos TLRs e da dectina-1 na resposta de monócitos e neutrófilos humanos à estimulação com leveduras de *P. brasiliensis*.

A análise da expressão de TLRs por citometria de fluxo mostrou que a estimulação de monócitos e neutrófilos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 – alta virulência e Pb265 – baixa virulência) resultou em alteração na expressão de superfície de TLR1, TLR2 e TLR4. Essa alteração foi similar àquela observada quando foram utilizados estímulos específicos para o TLR2 (zimosan) e TLR4 (LPS), demonstrando que componentes do fungo atuam de maneira similar a esses PAMPs, cujo efeito sobre os TLRs é reconhecido há muito tempo.

O estímulo com leveduras de *P. brasiliensis* levou à diminuição da expressão de todos os TLRs analisados em monócitos e a diminuição da expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos. Este efeito pode ser resultante do

reconhecimento e a internalização do fungo pelo fagócito e conseqüentemente do TLR ao qual ele se liga. Triantafilou e colegas (2006) verificaram que a estimulação com triacil lipoproteínas leva a internalização do heterodímero TLR1/TLR2. Outros estudos recentes demonstram o papel importante do reconhecimento dos TLRs e a conseqüente fagocitose de patógenos para a completa ativação das células, permitindo assim o desenvolvimento das funções efetoras das células fagocíticas (Blander Medzhitov, 2006; Blander, 2007).

Em nosso trabalho, a estimulação com LPS, além de interferir na expressão do TLR4 (seu receptor específico), também alterou, embora em menor grau, a expressão do TLR1 e TLR2. Este fato pode ser explicado pelo tipo de LPS utilizado para a estimulação das culturas. Segundo o fabricante, o Lipopolissacarídeo de *Escheriachia coli* O127:B8 (Sigma – cód. L3129) pode conter até 1% de contaminantes protéicos e outros carboidratos, que podem estar contribuindo para o reconhecimento do TLR1 e TLR2. Estudos mostraram que em associação com TLR2, o TLR1 reconhece triacil lipopeptídeos da parede de bactérias, bem como LPS atípicos (Uematsu e Akira, 2006). Apesar dessa possível resposta inespecífica ao LPS, foi possível verificar que a adição desse reagente nas culturas teve seu maior efeito na expressão do TLR4 e dessa forma, acreditamos que o uso desse tipo de LPS não inviabilizou as análises realizadas.

Os experimentos também permitiram verificar um maior efeito das leveduras de *P. brasiliensis* sobre o TLR2 (maior diminuição de expressão), e que esse receptor, é ativado mais precocemente (30 minutos) do que o TLR4 (60 minutos). Já o TLR4, além de participar do reconhecimento de PAMPs, auxilia na

produção de quimiocinas, como MIP-2 α , frente à estimulação por *C. albicans*, e no recrutamento de neutrófilos, melhorando assim a resposta imune (Roeder et al., 2004). Neste contexto a resposta mais tardia do TLR4 poderia ter um papel secundário na defesa do organismo contra fungos.

Trabalhos experimentais mostraram que leveduras de *P. brasiliensis* são reconhecidas por TLR-2 e TLR-4 em macrófagos o que resulta em aumento da atividade fagocítica e produção de NO, mas sem redução da carga fúngica (Calich et al., 2008). Estes resultados conflitantes sugerem que o reconhecimento via TLR-2 e TLR-4 pode representar um mecanismo de escape do fungo, facilitando sua livre proliferação no interior dos fagócitos.

Da mesma forma foi observado que a ligação do TLR2 pode ter um efeito protetor ou deletério na infecção *Candida albicans*, contribuindo tanto para a desativação de macrófagos pela secreção de altos níveis de IL-10, como pelo controle da resposta inflamatória pela indução de células T CD4+CD25+ com função regulatória (Netea et al., 2004).

Polimorfismos de um único nucleotídeo no gene do TLR-2 (Arg753Gln) foram associados à produção diferencial de citocinas e à suscetibilidade à tuberculose relacionada à diminuição da capacidade de macrófagos de produzirem citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12) (Ogus et al., 2004). Outro polimorfismo do gene do TLR2 (Arg677Trp) descrito em trabalhos realizados na Coreia foi associado à forma mais grave da hanseníase (forma lepromatosa) e relacionado à produção aumentada de IL-10 e diminuída de IL-12 (Kang e Chae, 2001; Kang et al., 2002; Kang et al., 2004). Tendo em vista esses antecedentes,

em trabalho anterior analisamos a ocorrência do polimorfismo I (Arg753Gln) em pacientes com PCM e controles saudáveis (manuscrito em preparação). Era nossa hipótese encontrar associação semelhante nos casos de PCM, uma vez que a resposta imunológica efetiva nessa doença é dependente de um padrão pró-inflamatório com ativação eficiente de macrófagos. Surpreendentemente obtivemos um resultado oposto, com uma frequência de ocorrência do polimorfismo Arg753Gln maior nos indivíduos do grupo controle, que mesmo expostos ao fungo (residem em zona endêmica), não desenvolvem a doença. Desta forma, nos pacientes o reconhecimento do fungo via TLR2 funcional poderia resultar em uma resposta de defesa deficitária e conseqüentemente maior suscetibilidade. Recentemente, Sutmuller et al (2006) demonstraram que o reconhecimento via TLR2 pode levar a indução de células T regulatórias (Treg), importantes no controle da resposta imunológica. Células Treg com atividade supressora foram descritas em infecções fúngicas tanto humanas (Cavassani et al. 2006) como experimentais (Montagnoli et al., 2002; 2006; Hori et al. 2002).

Na PCM, aparentemente as células Treg naturais apresentam um papel importante na supressão da resposta imunológica celular observada nos pacientes com a doença ativa. Cavassani (2006) e Moreira (2008) demonstraram que o número de células Treg está aumentado nos pacientes com a doença ativa, tanto na circulação periférica, como infiltrando os tecidos. Outro fato que pode corroborar a participação das células Treg na PCM é o fato de pacientes, com ambas as formas clínicas da doença, apresentarem produção elevada de IL-10

em relação aos indivíduos saudáveis (Oliveira et al., 2002; Mamoni e Blotta, 2005).

No presente trabalho a estimulação com células de *P. brasiliensis*, permitiu verificar que os monócitos apresentaram alteração na expressão de todos os TLRs analisados, enquanto que os neutrófilos apresentaram alteração somente na expressão de TLR2 e TLR4. Neutrófilos ativados via TLRs limitam a infecção por meio da fagocitose de patógenos, liberação de peptídeos anti-inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (Parker et al., 2005). Bellocchio e Moretti (2004) verificaram que TLRs expressos por neutrófilos polimorfonucleares murinos e humanos são capazes de reconhecer diferentemente hifas e conídios de *A. fumigatus*. Macrófagos ativados produzem compostos reativos com ação fungicida contra o *P. brasiliensis* como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (Nathan et al., 1983; Brummer Stevens, 1987; Gonzalez et al., 2000; Calvi et al., 2003; Netea et al., 2003).

Também observamos que a análise da expressão de TLRs não mostrou diferenças quanto as duas cepas de *P. brasiliensis* utilizadas para a estimulação das células. A estimulação de monócitos com células de *P. brasiliensis* resultou em um rápido (15 min) aumento na expressão relativa do RNAm de TLR2, mas não de TLR1 ou TLR4. Em relação aos neutrófilos não foram observadas diferenças significativas para nenhum TLR avaliado. Neste caso também as 2 cepas do fungo se comportaram de maneira semelhante.

Além dos TLRs, outros PRRs parecem estar envolvidos no reconhecimento das infecções fúngicas. A dectina-1, receptor da família das C-lectinas, tem sido

amplamente estudada dada a sua propriedade de reconhecer β -glucanas, importante componente da parede fúngica (Brown e Gordon, 2001; Robinson *et al.*, 2006, Dennehy e Brown, 2007). Diniz *et al.* (2004) verificaram que a fagocitose de partículas de zimosan e leveduras de *P. brasiliensis* é favorecida pela presença de pentraxina 3, sendo a dectina-1 o principal receptor envolvido.

Em nosso trabalho a estimulação de monócitos e neutrófilos com zimosan e leveduras de *P. brasiliensis* resultou em rápida (30 minutos) diminuição da expressão de dectina-1. Além disso verificamos que a cepa Pb265, que apresenta maior conteúdo de β -glucanos tende a induzir uma diminuição mais acentuada de dectina-1 na superfície de monócitos, do que a cepa Pb18. Em outros sistemas foi descrito que após a ligação o complexo dectina-1/glucano é rapidamente internalizado (Ariizumi *et al.*, 2000; Brown Gordon, 2001; Brown *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002).

A ligação de glucanos com dectina-1 promove a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Rogers *et al.*, 2005; Dillon *et al.*, 2006). Em um artigo recente, Ferreira *et al.* (2007) demonstraram que DCs de camundongos suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* apresentam aumento na expressão de TLR-2, associado à produção de níveis elevados de IL-10 e TNF- α , enquanto que DCs de camundongos resistentes apresentam menor expressão de TLR2 e baixa produção de ambas as citocinas, demonstrando que o agente etiológico da PCM apresenta mecanismos capazes de modular a resposta imunológica inata via TLR-2.

Vários estudos associam a IL-10 a uma resposta imunológica deficiente ao *P. brasiliensis*. Altos níveis de IL-10 são detectados no sobrenadante de culturas de CMSP de pacientes com PCM estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis*, (Oliveira *et al.*, 2002), enquanto que em culturas de células de pacientes tratados os níveis são bem menores (Diniz *et al.*, 2001). Além disso, a concentração do RNAm para IL-10 produzido por células de pacientes com a FJ é maior em relação aos pacientes com a FA e indivíduos com PI, mostrando a sua associação com as formas mais graves da doença (Mamoni e Blotta, 2005). Neworal *et al.* (2003) detectaram elevadas concentrações de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β , em linfonodos de pacientes com a forma juvenil da PCM, sugerindo que a estimulação da produção destes fatores pode representar um mecanismo de escape para o fungo tornando os macrófagos refratários aos efeitos estimuladores do IFN- γ e contribuindo para a evolução mais rápida da doença.

Apesar de mediar a produção de citocinas pró-inflamatórias, o TLR2 também desencadeia a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Estudos recentes demonstraram que *Yersinia enterocolitica* e *C. albicans* induzem imunossupressão por meio da produção de IL-10 mediada por TLR2 (Bellocchio e Montagnoli *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2004).

A análise da produção de citocinas (RNAm e proteína) mostrou que as leveduras de *P. brasiliensis* induzem a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias entretanto, o fato da razão TNF- α /IL-10 estar diminuída em resposta ao zimosan e a leveduras Pb265 indica uma produção relativa maior de IL-10

nestas situações, enquanto que o estímulo com Pb18 privilegia a produção de TNF- α .

Na PCM a persistência do fungo no hospedeiro na forma de latência é pouco compreendida. O inóculo fúngico pode sobreviver vários anos e servir como reservatório da doença, sendo reativado em condições de comprometimento da resposta imunológica (envelhecimento, alcoolismo, tabagismo, desnutrição). A liberação contínua de antígenos fúngicos desses reservatórios para a circulação mantém a infecção crônica, permite a evasão da resposta imunológica e leva a falhas terapêuticas. Ferreira et al. (2004) verificaram que a gp43 purificada de *P. brasiliensis*, assim como a infecção pelo fungo promovem a inibição da expressão de moléculas de MHC de classe II e da capacidade de adesão de células dendríticas, podendo assim reduzir a sua eficácia em ativar a resposta adaptativa. Similarmente foi demonstrado que a ligação de uma lipoproteína de 19 kDa derivada de *Mycobacterium tuberculosis* ao TLR-2 leva a inibição da sinalização via IFN- γ R em macrófagos humanos, o que resulta em diminuição da expressão de MHC classe II e, conseqüentemente, em falha no reconhecimento de antígenos por células T CD4+ (Gehring et al., 2003).

Em nosso estudo também verificamos que o tratamento de monócitos com LPS induziu a produção de concentrações elevadas de PGE₂, enquanto que o zimosan e leveduras do fungo não induziram uma resposta tão marcante. Entretanto, vale destacar que a cepa de menor virulência (Pb265) estimulou níveis um pouco mais elevados de PGE₂ do que as leveduras Pb18. A resposta de

neutrófilos foi similar a de monócitos, embora com a produção de níveis 10 vezes menores de PGE₂.

Vários estudos mostraram que a resposta inflamatória pode ter um efeito deletério na PCM. Michelin et al (2002) trataram camundongos infectados por *P. brasiliensis* com 3 tipos de inibidores da prostaglandina E₂ (PGE₂) e verificaram uma redução no tamanho dos granulomas no fígado e nos pulmões. Além disso, demonstraram que a PGE₂ exerce seu efeito imunossupressor na fase inicial da doença por meio de mecanismo dependente de IL-4 e IL-10. Similarmente, (Soares et al., 2001) e Bordon et al. (2007) verificaram respectivamente em camundongos e humanos que a inibição da produção de PGE₂ pelo tratamento com indometacina estimula a atividade fungicida de macrófagos e monócitos anteriormente incapazes de lisar leveduras de *P. brasiliensis*. Em outros modelos de infecção por microrganismos intracelulares a alta produção de PGE₂ por macrófagos foi associada à imunossupressão (Edwards et al., 1986).

Ribeiro (2005) em sua tese de doutorado estudou o papel dos leucotrienos na determinação da gravidade da doença em camundongos infectados com o *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e constatou que estes mediadores inibem a atividade fungicida de macrófagos facilitando o estabelecimento da infecção.

Desta forma podemos inferir que a interação inicial entre patógeno e hospedeiro que desencadeia uma forte resposta inflamatória não leva necessariamente a uma resposta Th1 protetora, mas parece ativar mecanismos regulatórios que suprimem a imunidade celular necessária para o controle da doença (Calich e Blotta, 2005).

Em conjunto, nossos resultados sugerem a participação do TLR-2, TLR-4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização do fungo, e conseqüente ativação da resposta imunológica ao *P.brasiliensis*. Além disso, no caso da infecção por Pb265 ficou mais evidente que a indução de uma resposta inflamatória exacerbada poderia ser compensada pela maior produção de IL-10, possibilitando melhor controle da infecção pelo hospedeiro.

A resposta imune inata dirigida contra os fungos envolve a complexa cooperação de diferentes PRRs, que reconhecem diferentes PAMPs e ativam a produção de citocinas e da resposta adaptativa. Neste contexto os TLRs e dectina-1 podem ser considerados alvos terapêuticos complementares ao tratamento convencional.

PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- a) De maneira geral a expressão de TLRs e dectina-1 na superfície de monócitos e neutrófilos diminui após exposição a leveduras das cepas de alta (Pb18) e baixa (Pb265) virulência de *P. brasiliensis*, indicando que o reconhecimento dos antígenos fúngicos resulta na rápida internalização dos receptores.
- b) A intensidade média de fluorescência relativa ao TLR-2 foi a maior dentre os receptores do tipo toll testados, mostrando a sua abundância na superfície de monócitos.
- c) A diminuição da expressão do TLR-4 induzida pelas leveduras do fungo na superfície de monócitos é mais tardia (60 minutos), quando comparado com o TLR-2. Este fato poderia indicar um papel secundário do TLR-4 na defesa do organismo contra o fungo.
- d) A intensidade de fluorescência da dectina-1 tende a diminuir mais em resposta ao Pb265, do que ao Pb18 após 30 minutos em cultura. Esses resultados sugerem que a cepa 265 estimula a maior internalização da dectina-1, provavelmente por apresentar maior conteúdo de β -glucanos.
- e) A frequência de células positivas para dectina-1 em monócitos foi maior do que em neutrófilos, demonstrando a abundância de dectina-1 nessas células.
- f) A expressão do RNAm para TLR2 em monócitos (15 minutos) e neutrófilos (30 minutos) mostrou uma tendência de aumento após a estimulação com

- as leveduras de *P. brasiliensis*, mostrando a participação deste receptor no reconhecimento do fungo.
- g) A expressão do RNAm para dectina-1 aumenta significativamente após estimulação com leveduras de *P. brasiliensis*, tanto em monócitos, como em neutrófilos, mostrando a participação deste receptor no reconhecimento do fungo.
- h) A expressão do RNAm para TNF- α , TGF- β e IL-10 tende a aumentar após a estimulação com leveduras das cepas Pb18 e Pb265, mostrando que o fungo estimula a produção de citocinas com atividade pró e anti-inflamatória.
- i) A estimulação com leveduras de *P. brasiliensis* leva a maior produção de TNF- α do que de IL-10 por monócitos. Entretanto, a razão TNF- α /IL-10 é menor na presença de zimosan e Pb265, mostrando uma concentração relativa maior de IL-10 na presença desses dois estímulos.
- j) Por outro lado, as leveduras da cepa Pb18 estimulam uma maior produção de TNF- α em relação a IL-10, indicando que esta cepa induz uma resposta inflamatória mais intensa no hospedeiro.
- k) A produção de PGE₂ em culturas de monócitos é mais elevada após a estimulação com LPS e Pb265. Em culturas de neutrófilos a produção de PGE₂ é maior em resposta a estimulação com LPS, zimosan e Pb265, embora em concentrações 10 vezes menores do que as observadas em monócitos. Estes dados sugerem que o fungo pode modular a produção de PGE₂ no hospedeiro.

Em conjunto, nossos resultados sugerem a importante participação do TLR-2, TLR-4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização do fungo, e conseqüente ativação da resposta imunológica ao *P. brasiliensis* (figura 29). Além disso, no caso da infecção por Pb265 a indução de uma resposta inflamatória exacerbada seria contrabalançada pela maior produção de IL-10, o que levaria a um melhor controle da infecção pelo hospedeiro.

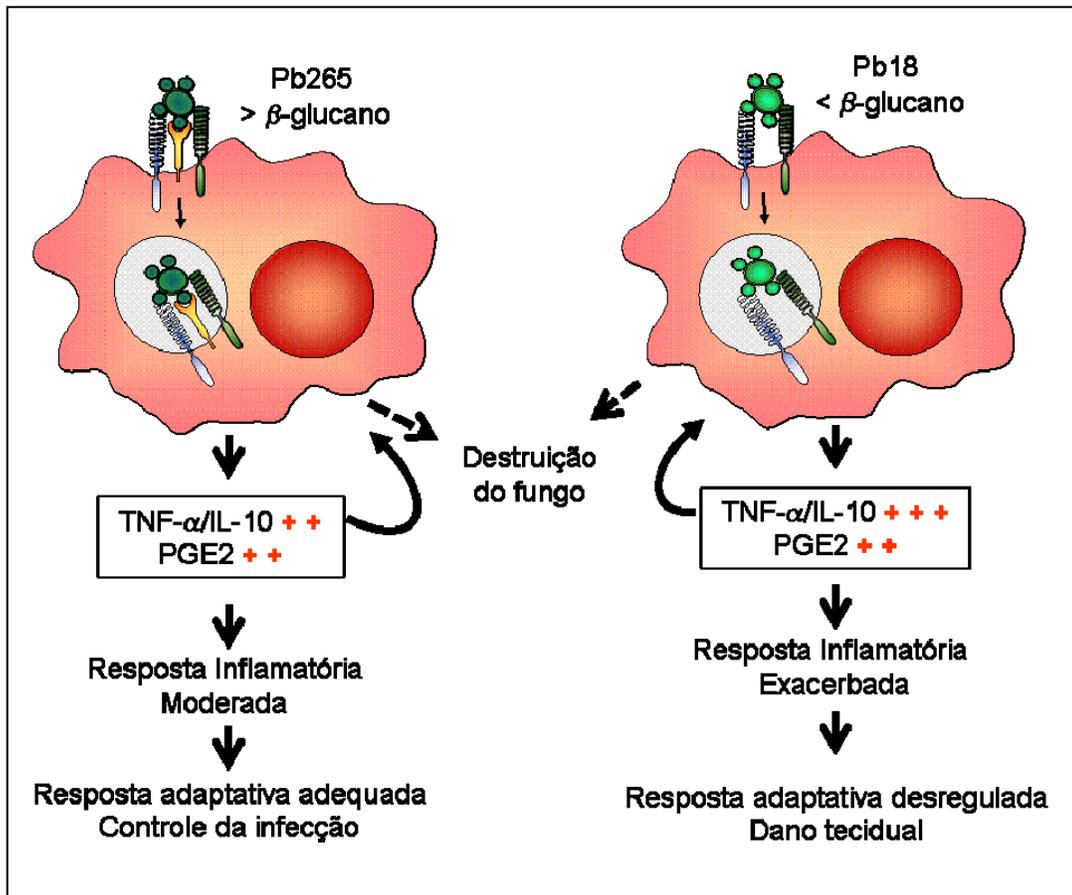


Figura 29. Esquema do reconhecimento diferencial das cepas de *P. brasiliensis*. Provavelmente, leveduras de baixa virulência são reconhecidas por receptores do tipo Toll associados com a dectina-1, o que induziria uma produção balanceada de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias. Já as leveduras de alta virulência, provavelmente, são reconhecidas apenas pelos receptores do tipo Toll, o que levaria a uma produção desbalanceada de citocinas e acarretaria, mais tarde, uma resposta imune desregulada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akira S Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.

Ariizumi K , Shen GL , Shikano S , Xu S , Ritter R, 3rd , Kumamoto T, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 2000; 275: 20157-67.

Bellocchio S , Montagnoli C , Bozza S , Gaziano R , Rossi G , Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3059-69.

Bellocchio S , Moretti S , Perruccio K , Fallarino F , Bozza S , Montagnoli C, et al. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 2004; 173: 7406-15.

Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 7-12.

Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001; 13: 248-52.

Bethlem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5: 319-25.

Blander JM. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol* 2007; 9: 290-9.

Blander JM Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006; 440: 808-12.

Bozzi A, Reis BS, Prado FL, Pedrosa EP, Leite MF, Goes AM. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. *Scand J Immunol* 2004; 60: 500-5.

Brown GD Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001; 413: 36-7.

Brown GD , Taylor PR , Reid DM , Willment JA , Williams DL , Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 2002; 196: 407-12.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89-117.

Brummer E Stevens DA. Activation of pulmonary macrophages for fungicidal activity by gamma-interferon or lymphokines. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 520-8.

Calich VLG, Blotta MHSL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In: Fidel Jr PL, uffnagle GB, eitors. New York: Springer; 2005. p.201-27.

Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 1-7.

Calvi SA , Peracoli MT , Mendes RP , Marcondes-Machado J , Fecchio D , Marques SA, et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* 2003; 5: 107-13.

Cavassani KA , Campanelli AP , Moreira AP , Vancim JO , Vitali LH , Mamede RC, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol* 2006; 177: 5811-8.

Dennehy KM Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 253-8.

Dennehy KM , Ferwerda G , Faro-Trindade I , Pyz E , Willment JA , Taylor PR, et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2008; 38: 500-6.

Dillon S , Agrawal S , Banerjee K , Letterio J , Denning TL , Oswald-Richter K, et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 2006; 116: 916-28.

Diniz SN , Cisalpino PS , Freire AT , Silva-Teixeira DN , Contigli C , Rodrigues Junior V, et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol* 2001; 62: 799-808.

Diniz SN , Nomizo R , Cisalpino PS , Teixeira MM , Brown GD , Mantovani A, et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 649-56.

Edwards CK, 3rd, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston RB, Jr., Pabst MJ. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma. *J Immunol* 1986; 136: 1820-7.

Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis* 2007; 196: 1108-15.

Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett* 2004; 94: 107-14.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. *Paracoccidioidomycosis*: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20: 129-32.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; 197: 1107-17.

Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2003; 71: 4487-97.

Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 2000; 68: 2546-52.

Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2007; 178: 3107-15.

Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 2006; 442: 651-6.

Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S. Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends Immunol* 2005; 26: 352-4.

Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol*. 2002; 32(5):1282-91

Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 53-8.

Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 2002; 20: 56-62.

Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 2004; 112: 674-80.

Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* 2007; 37: 467-78.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; *et al.* Paracoccidioidomicose. *In: Micologia Médica*, 9ª ed., p. 639-729, Sarvier Editora, S. Paulo, 2002.

LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*. 2007; 8(6):549-51.

Mamoni RL Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine* 2005; 32: 20-9.

Mamoni RL Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2006; 35: 207-16.

Mamoni RL , Nouer SA , Oliveira SJ , Musatti CC , Rossi CL , Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; 40: 153-9.

Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 237-41.

Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, et al. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2002; 169(11):6298-308

Montenegro, M.R.G. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 28: 203-204, 1986.

Moreira AP , Cavassani KA , Massafra Tristao FS , Campanelli AP , Martinez R , Rossi MA, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol* 2008; 180: 3049-56.

Mota NG , Rezkallah-Iwasso MT , Peracoli MT , Audi RC , Mendes RP , Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 765-72.

Nakamura K , Miyagi K , Koguchi Y , Kinjo Y , Uezu K , Kinjo T, et al. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 148-54.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983; 158: 670-89.

Netea MG , Gow NA , Munro CA , Bates S , Collins C , Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116: 1642-50.

Netea MG , Sutmuller R , Hermann C , Van der Graaf CA , Van der Meer JW , van Krieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172: 3712-8.

Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002; 185: 1483-9.

Netea MG , Warris A , Van der Meer JW , Fenton MJ , Verver-Janssen TJ , Jacobs LE, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* 2003; 188: 320-6.

Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2003; 21: 234-41.

Ogus AC , Yoldas B , Ozdemir T , Uguz A , Olcen S , Keser I, et al. The Arg753GLn polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004; 23: 219-23.

Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 2002; 4: 139-44.

Ozment-Skelton TR, Goldman MP, Gordon S, Brown GD, Williams DL. Prolonged reduction of leukocyte membrane-associated Dectin-1 levels following beta-glucan administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 540-6.

Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 886-92.

Pathak SK , Basu S , Basu KK , Banerjee A , Pathak S , Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 2007; 8: 610-8.

Ribeiro LRR. Caracterização do papel dos leucotrienos na paracoccidioidomicose (PCM) pulmonar e na atividade fungicida e secretora de macrófagos peritoneais infectados pelo *Paracoccidioides brasiliensis* [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005

Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 2006; 7: 1258-65.

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol* 2004; 12: 44-9.

Rogers NC , Slack EC , Edwards AD , Nolte MA , Schulz O , Schweighoffer E, et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005; 22: 507-17.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 1-23.

Romani L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol* 2008; 12:1-15.

San-Blas G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 1993; 24: 267-8.

Sansonetti PJ. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 1237-42.

Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; 166: 4620-6.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology* 1994; 140 (Pt 5): 1189-94.

Soares AM, Calvi SA, Peracoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102: 480-5.

Sutmuller RP, den Brok MH, Kramer M, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006;116(2):485-94

Taylor PR , Brown GD , Reid DM , Willment JA , Martinez-Pomares L , Gordon S, et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 2002; 169: 3876-82.

Taylor PR , Tsoni SV , Willment JA , Dennehy KM , Rosas M , Findon H, et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 31-8.

Triantafilou M , Gamper FG , Haston RM , Mouratis MA , Morath S , Hartung T, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 2006; 281: 31002-11.

Uematsu S Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006; 84: 712-25.

Vandesompele J , De Preter K , Pattyn F , Poppe B , Van Roy N , De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.

Villamon E , Gozalbo D , Roig P , Murciano C , O'Connor JE , Fradelizi D, et al. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida* -induced production of cytokines. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15: 263-71.

Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun* 2005; 73: 1553-60.

Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, Levitz SM. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect Immun* 2004; 72: 5373-82.

ANEXO

TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*.

Short Title: TLRs and dectin-1 expression in human paracoccidioidomycosis

Camila Vicente Bonfim, Ronei Luciano Mamoni, Maria Heloisa Souza Lima Blotta*.

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55 19 3521 9453; fax: +55 19 3521 9434.

e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic mycosis in Latin America caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The pattern of the immune responses to *P. brasiliensis* determines the disease progression and clinical outcome. Innate immune response is mediated by phagocytic cells, such as macrophage and neutrophils, which ingest and kill invading pathogens and then trigger the adaptive immune system through the secretion of cytokines and chemokines. The C-type like lectin receptors (CLR) and Toll-like receptors (TLRs) are the two main pattern recognition receptors in phagocytic cells that recognize fungal components. Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the expression of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 (CLR) in monocytes and neutrophils from healthy individuals after the stimulation with Pb18 (high virulence) and Pb265 (low virulence) yeasts of *P. brasiliensis*. As positive controls we used specific ligands to TLR-4 (LPS), TLR-2 and dectin-1 (zymosan). Our results demonstrated a decreased of TLRs and dectin-1 expression mainly on monocytes than on neutrophils, as soon as 30 minutes after yeast cells stimulation. This decrease was similar to the one caused by zymosan stimulation and indicates that up binding the complexes are rapidly internalized. There was a tendency towards an increased TLR2 and dectin-1 mRNA expression in response to fungal cells, mainly to Pb265. *P. brasiliensis* yeast cells induced the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, but the low ratio between TNF- α and IL-10 in response to zymosan and Pb265 point out to a balanced production of IL-10 and TNF- α , while Pb18 predominantly induced TNF- α secretion. Fungal cells also induced an elevated production of PGE₂ by monocytes and neutrophils showing their potential to provoke an intense inflammatory response. Altogether our results suggest the participation of TLR2, TLR-4 and dectin-1 in *P. brasiliensis* recognition, internalization and consequent activation of the immune response against the fungus. Moreover, in our system the preferential recognition of zymosan and Pb265 by TLR-2 and dectin-1 resulted in the production of adequate concentration of IL-10, able to counterbalance the excessive inflammatory response mediated by TNF- α and PGE₂. With these attributes the low virulence strain of *P. brasiliensis* would induce a controlled immune response beneficial to the host.

Keywords: TLR-2, TLR-4 , dectin-1, monocytes, *Paracoccidioides brasiliensis*

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic mycosis in Latin America caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* [1]. The pattern of the immune responses to *P. brasiliensis* determines the disease progression and clinical outcome. Cellular immune response plays a major role in the host defense against *P. brasiliensis* and macrophages are the most important effector cells that kill the fungus by oxidative mechanisms and cytokines production [2].

The first step for macrophage activation is the recognition of fungal components by pattern recognition receptors (PRRs) that signal to the host the presence of infection. The most important classes of PRR are the Toll-like receptors (TLRs) expressed in phagocytic cells and dendritic cells (DCs). Recent studies demonstrated the involvement of TLRs on fungal recognition such as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides posadasii* and *Cryptococcus neoformans* [3-8].

Studies with TLR-deficient mice showed that TLR-2 and TLR-4 have different role in the activation of innate immune response. Both can activate NF- κ B and induce the expression of inflammatory cytokines and costimulatory molecules by macrophages and dendritic cells, suggesting that TLRs participate of innate and adaptive immune response [3]. Netea et al (2002) verified that TLR-4 deficient mice are more susceptible to disseminated candidiasis than the corresponding wild type and that this effect was mediated by the deficient production of KC and MIP-2 chemokines, resulting in the decrease of neutrophils recruitment to the site of infection [5]. They also showed that TNF- α and IL-1 β production was strongly dependent on TLR-2 activation suggesting that a same pathogen can activate different TLRs [5, 9]. All TLRs (except TLR-3) signal via the adapter molecule MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) [10]. MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Candida albicans* infection due to deficient phagocytic activity and low cytokine production [3, 11].

Macrophages of TLR-2 and TLR-4-deficient mice infected by *P. brasiliensis* display low phagocytic activity and secrete low concentrations of NO, IL-12 and MCP-1 in association with high IL-10 levels, however these alterations do not reflect in higher levels of mortality [12].

P. brasiliensis is a dimorphic fungus and the transition to yeast form is required for the establishment of the disease. During conversion to the pathogenic form the composition of the cell wall change to express an increased content of α -glucan ([13]. The level of α -glucan in the cell wall correlates with the virulence. High virulence strains of *P. brasiliensis* like Pb18 exhibit high levels of α -glucan in the cell wall, while Pb265 (low virulence) express high levels of β -glucan [14]. The presence of high concentration of α -glucan in the outermost layer of the yeast cell wall may contribute to the pathogenesis by hiding immunostimulatory β -glucan from detection by host phagocytic cells.

Successful infection by fungal pathogens depends on the subversion of host immune mechanisms that detected conserved cell-wall components such as β -glucans, which are recognized by dectin-1 receptors on host phagocytes [15]. Dectin-1, a lectin-like receptor, mediates the inflammatory response to fungi and facilitates pathogen clearance[16]. Dectin-1 is expressed at high levels on blood and splenic monocytes, neutrophils and alveolar and inflammatory macrophages and at low levels on dendritic cells and T cells [17].

In this paper we aimed to analysed TLR1, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 (protein and mRNA) expression in monocytes and neutrophils from normal donors stimulated by *P. brasiliensis* yeast cells of low (Pb265) and high (Pb18) virulence.

Material and Methods

Blood

Heparinized peripheral venous blood was obtained from normal healthy donors This research was approved by the Medical School Ethic Committee of State University of Campinas (UNICAMP) and informed consent was obtained from each participant.

***P. brasiliensis* yeast cells**

Yeast cells of *P. brasiliensis*: Pb18 (high virulence) and Pb265 (low virulence) were maintained in Fava-Netto's culture medium at 35°C for 5 days, and collected. The yeast cells were washed in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) and homogenized with glass beads in a Vortex homogenizer. Yeast viability was determined with Jannus

Green B vital dye (Merck, Darmstad, Germany). Were utilized yeast cells presenting viability superior to 80%.

Monocyte and neutrophil separation

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were isolated by centrifugation on Ficoll-Hypaque solution [density: 1.077] (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden). The number of cells was determined and the monocytes (CD14⁺ cells) were purified with a positive selection kit (CD14⁺ MicroBead - MACS - Miltenyi Biotec), according the manufacturer instructions. The neutrophils were isolated from the buff-coat obtained after the removal of PBMCs. The cells were washed and centrifuged on a second Ficoll-Hypaque solution [density: 1.199] (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden). The cells were collected and incubated for ten minutes in a lyses buffer to disrupt contaminating red blood cells. Separated neutrophil and monocytes were washed twice with cold PBS and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2mM-Glutamine (Sigma, St Louis, USA), gentamicin (5mg/mL – Sigma) and 10% heat inactivated normal human AB serum, at a concentration of 2×10^6 cells/mL.

Culture conditions

The cells were cultured in 24 wells plates (Costar, Cambridge, MA, USA) at 37° in 5% CO₂ atmosphere. Cultures were maintained unstimulated (US) or were stimulated with LPS (1µg/ml - Sigma, St Louis, USA), zymosan (10µg/ml-Sigma, St Louis, USA) or live *P. brasiliensis* yeast cells (strains Pb18 or Pb265), at 1 yeast to 50 cells ratio. For flow cytometry experiments the cells were stimulated for 30 and 60 minutes; for qRT-PCR analyses the cell was cultured for 15 and 60 minutes and for the determination of cytokine and PGE2 production for 24 hours. All reagents, buffers and solutions utilized were tested for the presence of contaminating endotoxin with Limulus Amebocyte Lysate (Pyrotell, Associates of Cape Cod Incorporated, Faumouth, MA).

Flow cytometry

For the detection of surface molecules, the cells were resuspended at 1×10^7 cells/mL in reaction buffer (PBS-sodium azide (2 mM)-BSA (1%)) and 20 µL of this suspension was added to 96 wells plates containing a mixture of monoclonal antibodies: biotin-labeled anti-

TLR-1, anti-TLR-2 and anti-TLR-4, and monoclonal anti-dectin-1 (mouse IgG2b) (R&D Systems – Minneapolis - USA); anti-CD14-FITC and anti-CD16-FITC (Caltag-Invitrogen, Carlsbad – USA). After 15 minutes of incubation the cells were washed and was added streptavidin-PE (R&D Systems) for TLRs or anti-mouse-IgG2b-PE for dectin-1 labeling (Caltag-Invitrogen, Carlsbad – USA). The cells were incubated for 20 minutes, then washed and fixed with paraformaldehyde (2% in PBS). In the experiments performed to determine the occurrence of receptor internalization, after the surface staining the cells were permeabilized with PBS-saponin (0,5%) solution for 10 minutes, and incubated with the same antibodies for 30 minutes, washed and with the secondary reagents for 15 minutes. After fixation the samples were analyzed on a FACScalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences – Frankles Lakes - USA), with selection of the neutrophil and monocyte/macrophage regions (gates).

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from cells with TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) according the manufacturer instructions. Samples were quantified using an UV spectrophotometer, GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia, Bucks, UK). Before cDNA synthesis the samples were treated with 1 U of human DNaseI (Ambion – Applied Biosystems, California - USA) for 30 min at 37°C and then treated with EDTA (0,5M) to stop the reaction. The samples were then reverse transcribed with 200 U SuperScript II (Invitrogen Co) and oligo(dT) 12–18 (Invitrogen Co) for 50 min at 40°C. The enzymatic activity was removed incubating the samples for 5 min at 90°C.

QRT-PCR protocol

Synthetic oligonucleotide primers were designed through PrimerExpress software (Applied Biosystems, California - USA), using cDNA sequences obtained in the GeneBank (see table I for primers sequences and the accession number). All samples were assayed in a 10 µL volume, containing 5 ng cDNA, 5 µL of SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems) and 150 nm of specific primers. Amplification was carried out in a 48-well reaction plate equipment (StepOne 48- Applied Biosystems) using the following reaction conditions: 95 °C melting for 15 s, 60°C annealing/ extension for 1 min. Two replicas of

each sample were run on the same plate and a dissociation curve was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. To confirm the reproducibility and accuracy of each reaction, the intra-assay precision (R2) was analyzed and accept if more than 0.99. The transcripts assayed demonstrated real-time PCR efficiency rates over 90% for all primers. GAPDH and UBC were utilized as reference genes. To determine the relative gene expression, the GeNorm program was utilized [18]

ELISA

Commercial kits for TNF- α , IL-10, (Duoset ELISA; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) and prostaglandinE2 (Biotrack (EIA) System GE HealthCare, Brickinghamshire – UK), were utilized following the manufacturer instructions. The detection limits were 15,62 pg/mL for TNF- α , 31,2 pg/mL for IL-10 and 2,5 pg/mL for prostaglandinE2.

Statistical analysis

Values are presented as medians. Comparisons were made using the Kruskal–Wallis nonparametric test or the Wilcoxon’s rank-sum test for paired samples. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The first set of experiments intended to verify the expression of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 on monocytes and neutrophils from normal donors by flow cytometry. In all experiments LPS and zymosan were used as positive controls.

A significant decrease in TLR-1 expression was observed when monocytes were stimulated for 30 minutes with LPS and *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 and Pb265), but not with zymosan. After 60 min the only difference that remained was in relation to LPS (fig. 1A). TLR-2 expression was very high in unstimulated monocytes and significantly decreased after stimulation for 30 minutes with LPS, zymosan and *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 and Pb265). After 60 minutes the differences were no longer observed (fig. 1B).

The frequency (%) of TLR-1⁺ and TLR2⁺ monocytes did not change after the stimulation for 30 or 60 minutes with LPS, zymosan, Pb18 or Pb265 (data not shown).

The expression of TLR-4 on monocytes decreased only in the presence of LPS (data not shown), but a strong effect was detected in relation to the frequency of TLR-4⁺ cells (fig. 1C). The percentage of TLR-4⁺ cells dropped almost 15% in the presence of LPS in 30 minutes of culture and around 25% in 60 minutes. In addition, *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 and Pb265) also induced a decay in the number of TLR-4⁺ cells, but only at 60 minutes (fig. 1C). Zymosan stimulation provoked a marked decrease in dectin-1 expression on monocytes. *P. brasiliensis* yeast cells also led to a significant decrease in dectin-1 expression at 30 min, but in a lower intensity (fig. 1D). At 60 min, in addition to zymosan, only Pb265 yeast cells were able to induce a decrease in dectin-1 expression (fig. 1D).

The expression of TLR-1 in neutrophils was similar in all conditions and no differences were observed in relation to unstimulated cells (fig. 2A). The only significant difference was detected in neutrophils stimulated with zymosan that expressed lower levels of TLR-1 in relation to LPS (fig. 2A). Differently, an impressive reduction on TLR-2 expression was detected mainly in response to fungal cells stimulation, but also triggered by LPS and zymosan at 30 min of culture (fig. 2B). At 60 min there was a general decrease in TLR-2 expression compared to 30 min and no significant differences were detected between unstimulated and stimulated cells. The only significant difference was detected in neutrophils stimulated with LPS that expressed lower levels of TLR2 in relation to Pb265 (fig. 2B).

The expression of TLR-4 in neutrophils did not change in response to any of the stimuli (data not shown). However, the frequency of TLR-4⁺ cells notably decreased in response to LPS and in a smaller extension to Pb265 yeast cells (fig. 2C). A significant difference was detected between Pb18 and Pb265, with a lower percentage of TLR-4⁺ cells in the latter at 30 min, but not at 60 min (fig. 2C). Dectin-1 expression on neutrophils decreased only in the presence of zymosan (data not shown). Differently, the frequency of dectin-1⁺ cells markedly decrease in response to LPS but not to zymosan in both 30 and 60 min (fig. 2D). The stimulation with Pb265, but not Pb18 induced a small but significant decrease the percentage of dectin-1⁺ cells at 30 min (fig. 2D)

To assess if the decrease of TLRs and dectin-1 on cell surface was due to internalization we performed experiments in which surface and total (surface plus intracellular) labeling were compared before (unstimulated) and after stimulation. In unstimulated cells, surface and total labeling for TLR-1, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 were almost the same, as expected. LPS, zymosan, Pb 18 or Pb265 stimulation resulted in small differences between surface and total labeling for TLR-1 (fig. 3A). The analysis of total labeling for TLR-2 showed a considerable increase in relation to surface labeling, mainly in response to zymosan, but also to *P. brasiliensis* yeast cells, suggesting that these receptors may have been internalized (fig. 3B).

LPS probably induced the highest internalization of TLR-4 followed by Pb265, since the difference between total and surface labeling was around 150% and 80% respectively (fig. 3C). Stimulation with Pb265 induced a high difference between total and surface labeling for dectin-1 indicating the internalization of the fungal cell and the receptor. Zymosan and then Pb18 stimulation also had an effect but in a small proportion (fig. 3D).

In the next set of experiments we evaluated TLRs and dectin-1 mRNA expression after stimulation with *P. brasiliensis* yeast cells. Initial experiments were performed to assess the effect of specific ligands on monocytes. In general LPS induced TLR-1 and TLR-4 mRNA expression, while zymosan promoted TLR-2 and dectin-1 mRNA expression (data not show). *P. brasiliensis* yeast cells did not induce TLR-1 mRNA expression in monocytes, since no differences were detected in relation to unstimulated cells, neither at 15 nor at 60 min (fig. 4A).

In relation to TLR-2 mRNA expression, at 15 min there was a tendency towards an increase in monocytes stimulated with both Pb18 and Pb265 yeast cells. At 60 min there was an increase in TLR-2 mRNA expression in all conditions but without significant difference among them (fig. 4B). The stimulation with *P. brasiliensis* yeast cells did not result in any difference in TLR-4 mRNA expression in relation to unstimulated cells neither at 15 nor at 60 min (fig. 4C).

The expression of dectin-1 mRNA was significantly higher in monocytes stimulated for 15 min with Pb265 in relation to unstimulated cells and Pb18 (tendency). Differently, at 60 min Pb265 and in a smaller extension Pb18 were both able to induce significantly higher expression of dectin-1 mRNA in relation to unstimulated cells (fig. 4D).

As demonstrated for monocytes, TLR-1 mRNA expression in neutrophils showed no variation in response to stimulation with fungal cells at any time analyzed (fig. 5A). On the other hand, Pb265 induced an increase in TLR-2 mRNA expression as soon as 15 minutes (tendency) and more evidently at 60 minutes, when Pb18 also had a positive effect (fig.5B). Pb18 yeast cells were able to strongly stimulate TLR-4 mRNA expression after 60 minutes. However, Pb265 did not show any effect over TLR-4 mRNA expression (fig. 5C).

Pb265 had a strong effect on dectin-1 mRNA expression in neutrophils as soon as at 15 minutes of culture (fig. 5D). However, at 60 minutes dectin-1 mRNA returned to basal levels even in the presence of fungal cells (fig. 5D).

In order to evaluate the impact of *P. brasiliensis* yeast cells stimulation on cytokine production we determined the levels of TNF- α and IL-10 in monocytes supernatants. LPS and zymosan induced substantial levels of TNF- α production in 24-h monocytes cultures. The stimulation with Pb18 also induced significant production of TNF- α , although in lower levels as compared to LPS and zymosan (fig. 6A).

Similarly LPS and zymosan stimulation resulted in elevated production of IL-10, while *P. brasiliensis* yeast cells induced only basal levels (fig. 6B).

The evaluation of TNF- α /IL-10 ratio showed that Pb18 induced an imbalance towards an inflammatory response with a predominance of TNF- α . Differently, in relation to Pb265 the induction of IL-10 counteracted TNF- α production, in a balance probably positive for the host (fig. 6C).

LPS induced high levels of PGE₂ in monocytes supernatants followed by zymosan, Pb265 and Pb18 (fig. 7A). However, besides LPS, the only significant difference was observed in relation to Pb265 (fig. 7A). The production of PGE₂ by neutrophils almost followed the same pattern as for monocytes, although in concentrations 10 times lower. In relation to unstimulated cells, LPS, zymosan and PB265 were able to induce significant higher levels of PGE₂ (fig. 7B).

DISCUSSION

Structural polysaccharides of fungal cell wall like β -glucans, chitin and mannan are highly conserved among the fungus and considering that the cell wall is critical for growth and survival, these constituents are ideal PAMPs.

The analysis of TLRs expression by flow cytometry showed that the stimulation of monocytes and neutrophils with *P. brasiliensis* yeast cells resulted in alteration of TLR-1, TLR-2, TLR-4 expression on cell surface. The alterations were similar to the ones induced by specific ligands for TLR-2 (zymosan) and TLR-4 (LPS) showing that these components of the fungal cells act in a similar manner as these PAMPs which effect on TLRs are recognized for a long time.

The stimuli with *P. brasiliensis* yeast cells resulted in decrease of all TLRs expression in monocytes and of TLR-2 and TLR-4 in neutrophils. This effect may be a result of the recognition and internalization of the fungus by the phagocytic cell and consequently of the receptor to which they bind. Triantafilou et al (2006) verified that stimulation with triacyl lipopeptides led to the internalization of the heterodimer TLR-1/TLR-2. Recent studies have shown the important role of TLRs recognition and phagocytosis of the pathogen to the complete cell activation and development of all effector functions of the cell [19, 20].

In our study the stimulation with LPS, in addition to TLR-4, also altered the expression of TLR1 and TLR-2, although in a smaller proportion. The LPS used in the cultures may explain this fact. According to the manufacturer Lipopolysaccharide of *E. coli* 0127:B8 (Sigma L3129) may contain up to 1% of protein contaminants and other carbohydrate that may contribute to the recognition of TLR-1 and TLR-2. Studies have shown that in association with TLR-2, TLR-1 recognizes triacyl lipopeptides of bacterial wall, as well as atypical LPS [21]. However, although we observed an inespecific response to LPS, it was possible to verify that the addition of LPS in the cultures induced a striking effect on TLR-4 expression.

P. brasiliensis yeast cells induced a higher and earlier (30 min) decrease on TLR-2 expression as compared to TLR-4 (60 min). TLR-2 is able to bind to many ligands what enable it to recognize PAMPs on different pathogens. The versatility of TLR-2 recognition is mostly due to its capacity to act together with other TLRs molecules such as TLR-1 and TLR-6 [10]. In such way TLR-2 may give rise to different types of responses such as pro-

inflammatory (TNF- α and IL-12p40 production) and anti-inflammatory, with IL-10 production being used by some pathogens as an evasion mechanism [22, 23]. On the other hand, TLR-4 also induces the production of cytokines such as MIP-2 α in response to *Candida albicans* and in the recruitment of neutrophils [24]. In this context the late response of TLR-4 could have a secondary role in the defense of against fungi.

The stimulation of monocytes with *P. brasiliensis* yeast cells altered TLR 1, 2 and 4 expression on monocytes while only TLR-2 and TLR-4 on neutrophils. Neutrophils activated via TLRs are able to limit the infection by the phagocytosis of pathogens, the release of anti-inflammatory peptides and pro-inflammatory cytokines [25]. Bellochio et al (2004) verified that TLRs expressed in murine and human neutrophils can differently recognize hyphae and conidia of *Aspergillus fumigatus* [26] Activated macrophages produced oxygen reactive products with fungicidal activity against *P. brasiliensis* such as nitric oxide and hydrogen peroxide [27-31].

Experimental studies showed that *P. brasiliensis* yeast cells are recognized by TLRs on macrophages resulting in increased phagocytic activity and NO production, but without reducing the fungal burden [12]. These conflicting results suggest that the recognition via TLR-2 e TLR-4 may represent an escape mechanism that allows the fungus to replicate inside the phagocytes.

It was also observed that TLR2 ligation may have a protective or deleterious effect over the infection with *Candida albicans*, contributing for macrophages deactivation by the secretion of high levels of IL-10 or by the control of inflammatory response by the induction of T CD4+CD25+ regulatory cells (Treg) [32].

Recently Sutmuller et al (2006) demonstrated that TLR2 have an important role in inducing the expansion and control of Treg cells. These cells are very import in the control of the immune response since in their absence there is an exacerbation of the inflammatory response and the occurrence of autoimmune diseases, while their excessive activation may be associated to susceptibility to different pathogens [33].

The number of Treg is elevated in patients with active PCM both in peripheral blood and lesions [34, 35]. Another fact that corroborates the participation of Treg cells in PCM is the elevated production of IL-10 in patients compared to healthy donors [36, 37].

The analysis of TLRs expression did not show differences between the Pb18 and Pb265 strains of *P. brasiliensis* yeast cells, except the frequency of TLR-4⁺ neutrophils that decreased after Pb265, but not Pb18 stimulation.

The stimulation of monocytes with *P. brasiliensis* resulted in a rapid (15 min) increase in the relative expression of TLR-2, but not of TLR-1 or TLR-4 mRNA. Again no differences were detected between Pb18 and Pb265.

Along to TLRs another PRRs have been demonstrated a crucial role in fungal cells recognition. Dectin-1, a receptor of the C-lectin family has been studied due to its capacity to recognize β -glucans, important component of fungal wall [38-40]. Diniz et al (2004) showed that blocking dectin-1 molecules decreased the phagocytosis of zymosan particles and *P. brasiliensis* yeast cells, with a negative effect over the production of oxygen reactives [41].

In our study the stimulation of monocytes and neutrophils with zymosan and *P. brasiliensis* yeast cells resulted in a rapid (30 min) decrease of dectin-1 expression. In addition, Pb265 that contains a high concentration of β -glucan was able to induce a higher reduction in dectin-1 expression on monocytes surface than Pb18. In another systems it was described that after the ligation of dectin-1/ β -glucan the complex is rapidly internalized [17, 38, 42, 43].

The ligation of glucans with dectin-1 induces the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 [44, 45]. In a recent paper Ferreira et al (2007) demonstrated that DCs of mice susceptible to *P. brasiliensis* infection expressed elevated levels of TLR-2 associated to the production of high concentrations of IL-10 and TNF- α [46]. On the other hand, resistant mice exhibited low levels of TLR-2 and low production of both cytokines, showing that *P. brasiliensis* is able to modulate the innate immune response via TLR-2.

Many studies have shown an association between IL-10 production and a deficient response to *P. brasiliensis*. High levels of IL-10 are detected in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with active PCM stimulated with fungal antigens [37], while after antifungal treatment the levels are lower [47]. In addition, the concentration of IL-10 mRNA in PBMCs from patients with the juvenile form of PCM is higher compared with patients with the adult form and individuals with PCM-infection, showing the association of IL-10 with severe forms of the disease [36].

The analysis of cytokine production showed that *P. brasiliensis* yeast cells induced the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, but the low ratio between TNF- α and IL-10 in response to zymosan and Pb265 point out to a preferential production of IL-10, while Pb18 predominantly induced TNF- α secretion.

Fungal cells also induced an elevated production of PGE₂ by monocytes and neutrophils showing the important role of this mediator in fungus-host relationship. Recent studies have shown that the inflammatory response may have a deleterious effect in PCM. Michelin et al treated infected mice with 3 types of prostaglandin (PGE₂) inhibitors and verified a reduction in granuloma size in the liver and lungs. In addition they showed that PGE₂ has an immunosuppressive effect at the beginning of the infection by a mechanism dependent on IL-10 and IL-4 [48]. Similarly it was described that the inhibition of PGE₂ by indometacin stimulates the fungicidal activity of macrophages and monocytes, previously unable to kill *P. brasiliensis* yeast cells [49, 50].

Altogether our results suggest the participation of TLR2, TLR-4 and dectin-1 in *P. brasiliensis* recognition and internalization and consequent activation of the immune response against the fungus. Moreover, the capacity of Pb265 to stimulate TLR-2, dectin-1 and the production of IL-10 may account for the induction of a controlled immune response beneficial to the host.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993;5:115-49.

2. Calich VL, Blotta MHS. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In: Fidel PL, Huffnagle GB, editors. *Fungal Immunology*. New York: Springer; 2005. p. 201-27.
3. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):3059-69.
4. Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, et al. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Jun;47(1):148-54.
5. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschuere I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002 May 15;185(10):1483-9.
6. Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4620-6.
7. Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun*. 2005 Mar;73(3):1553-60.
8. Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, Levitz SM. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5373-82.
9. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis*. 2003 Jul 15;188(2):320-6.
10. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.
11. Villamon E, Gozalbo D, Roig P, Murciano C, O'Connor JE, Fradelizi D, et al. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida* -induced production of cytokines. *Eur Cytokine Netw*. 2004 Jul-Sep;15(3):263-71.
12. Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jun;53(1):1-7.
13. San-Blas G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res*. 1993 Autumn;24(3):267-8.
14. Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. 1994 May;140 (Pt 5):1189-94.
15. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jan;6(1):33-43.
16. Gow NA, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis*. 2007 Nov 15;196(10):1565-71.
17. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, 3rd, Kumamoto T, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):20157-67.

18. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
19. Blander JM. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol.* 2007 Feb;9(2):290-9.
20. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* 2006 Apr 6;440(7085):808-12.
21. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801.
22. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):610-8.
23. Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1642-50.
24. Roeder A, Kirschning CJ, Schaller M, Weindl G, Wagner H, Korting HC, et al. Induction of nuclear factor- κ B and c-Jun/activator protein-1 via toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated *Candida albicans*. *J Infect Dis.* 2004 Oct 1;190(7):1318-26.
25. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005 Jun;77(6):886-92.
26. Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, et al. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol.* 2004 Dec 15;173(12):7406-15.
27. Brummer E, Stevens DA. Fungicidal mechanisms of activated macrophages: evidence for nonoxidative mechanisms for killing of *Blastomyces dermatitidis*. *Infect Immun.* 1987 Dec;55(12):3221-4.
28. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 1983 Sep 1;158(3):670-89.
29. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000 May;68(5):2546-52.
30. Calvi SA, Peracoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003 Feb;5(2):107-13.
31. Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2003 Mar 7;21(5):234-41.
32. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3712-8.
33. Suttmuller RP, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* 2006 Aug;27(8):387-93.

34. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9):5811-8.
35. Moreira AP, Cavassani KA, Massafera Tristao FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol.* 2008 Mar 1;180(5):3049-56.
36. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine.* 2005 Oct 7;32(1):20-9.
37. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002 Feb;4(2):139-44.
38. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 2001 Sep 6;413(6851):36-7.
39. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol.* 2006 Dec;7(12):1258-65.
40. Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol.* 2007 Aug;82(2):253-8.
41. Diniz SN, Reis BS, Goes TS, Zouain CS, Leite MF, Goes AM. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* 2004 Jan 2;22(3-4):485-92.
42. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med.* 2002 Aug 5;196(3):407-12.
43. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3876-82.
44. Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):916-28.
45. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity.* 2005 Apr;22(4):507-17.
46. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis.* 2007 Oct 1;196(7):1108-15.
47. Diniz SN, Cisalpino PS, Freire AT, Silva-Teixeira DN, Contigli C, Rodrigues Junior V, et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol.* 2001 Aug;62(8):799-808.
48. Michelin MA, Figueiredo F, Cunha FQ. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Parasitol.* 2002 Nov-Dec;102(3-4):170-7.
49. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Serrao Peracoli MT, Victoriano de Campos Soares AM. Prostaglandin E2 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect.* 2007 May;9(6):744-7.

50. Soares AM, Calvi SA, Peracoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology*. 2001 Apr;102(4):480-5.

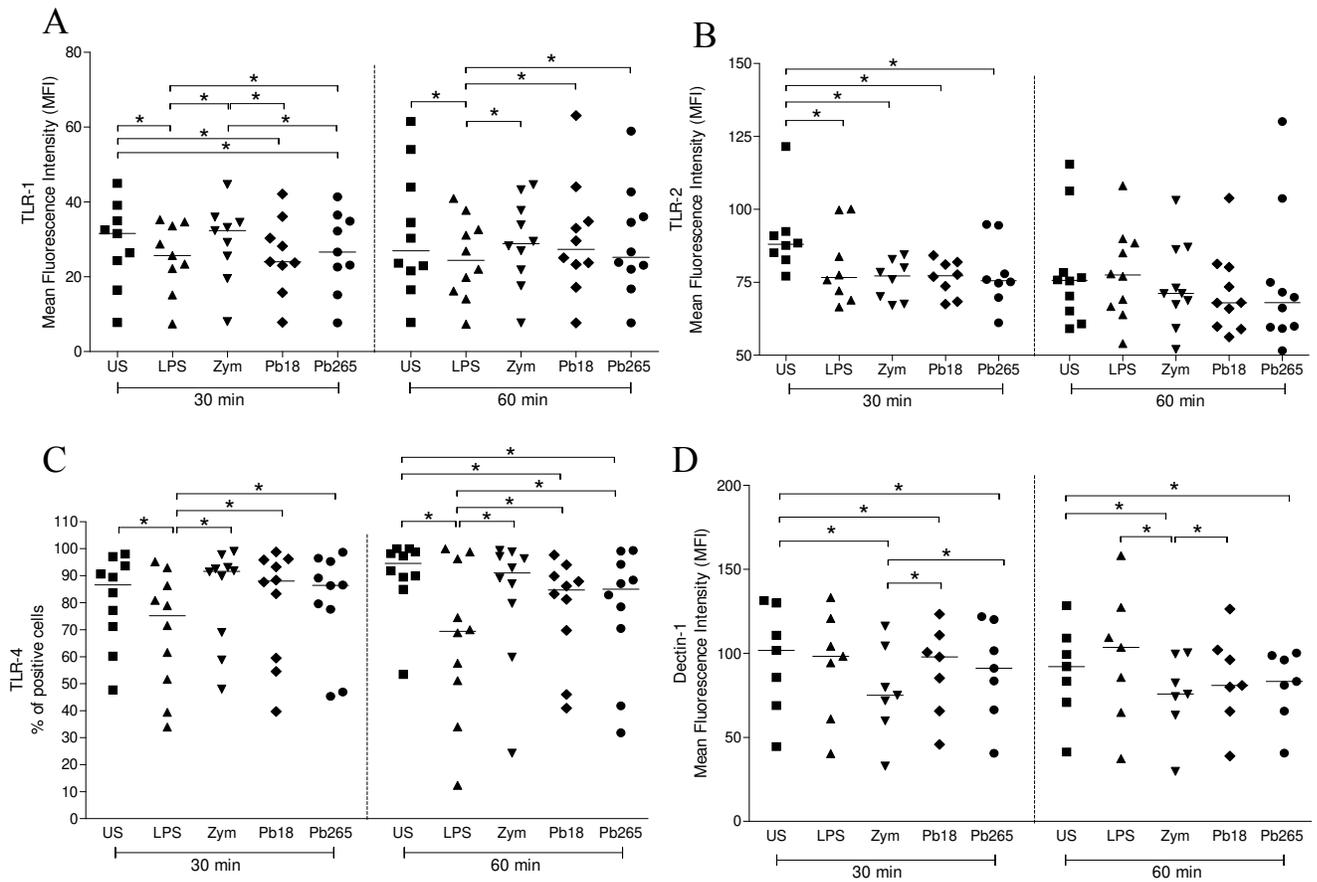


Figure 1. TLR-1 (A), TLR-2 (B), TLR-4 (C) and dectin-1(D) expression on monocytes from normal donors unstimulated (US) and stimulated with LPS (10 μ g/mL), zymosan (10 μ g/mL) or *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265), for 30 or 60 minutes. Data are expressed as Mean Fluorescence Intensity for TLR-1, TLR-2, dectin-1, and as % of positive cells for TLR-4. Horizontal bars represent median. * p <0.05, Wilcoxon.

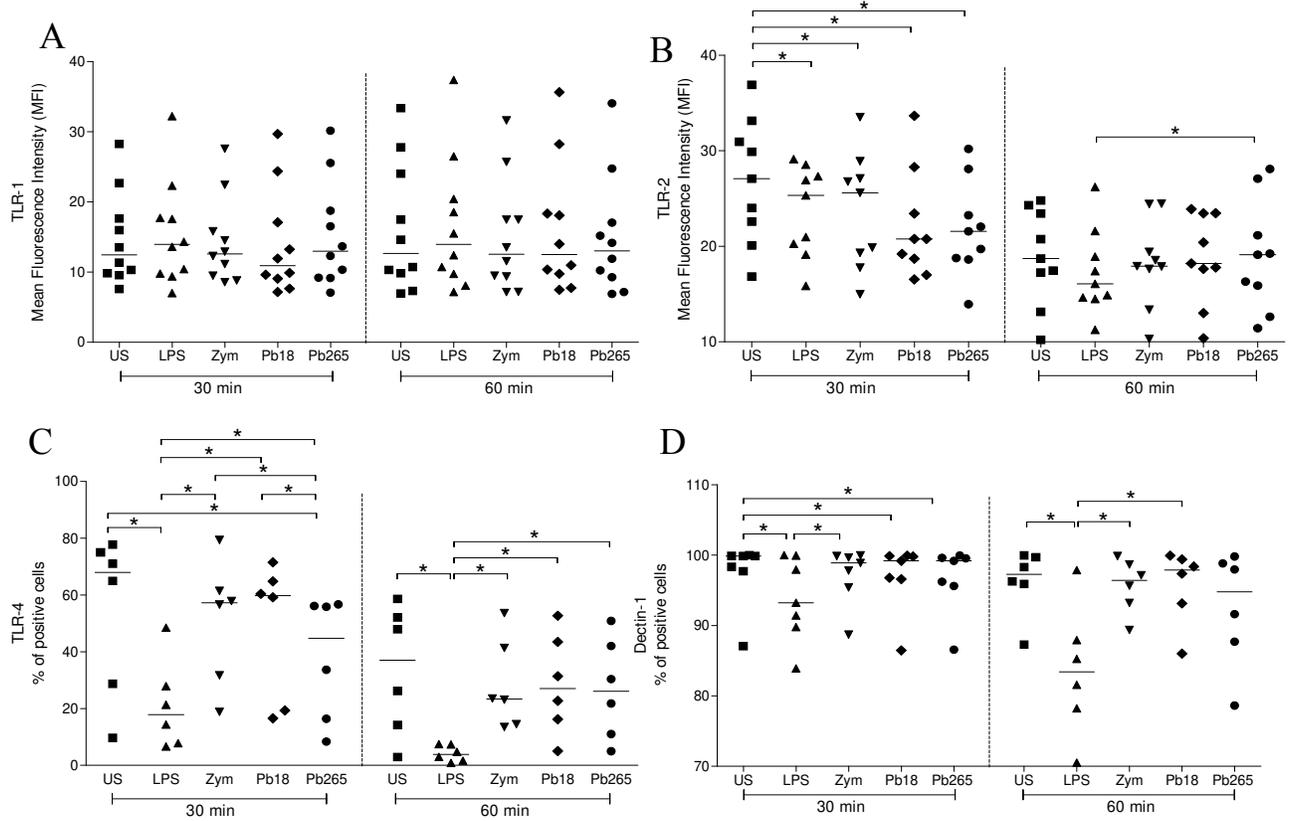


Figure 2. TLR-1 (A), TLR-2 (B), TLR-4 (C) and dectin-1(D) expression on neutrophils from normal donors unstimulated (US) and stimulated with LPS (10 μ g/mL), zymosan (10 μ g/mL) or *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265), for 30 or 60 minutes. Data are expressed as Mean of Fluorescence Intensity for TLR-1, TLR-2, and as % of positive cells for TLR-4 and dectin-1. Horizontal bars represent median. *p<0.05, Wilcoxon.

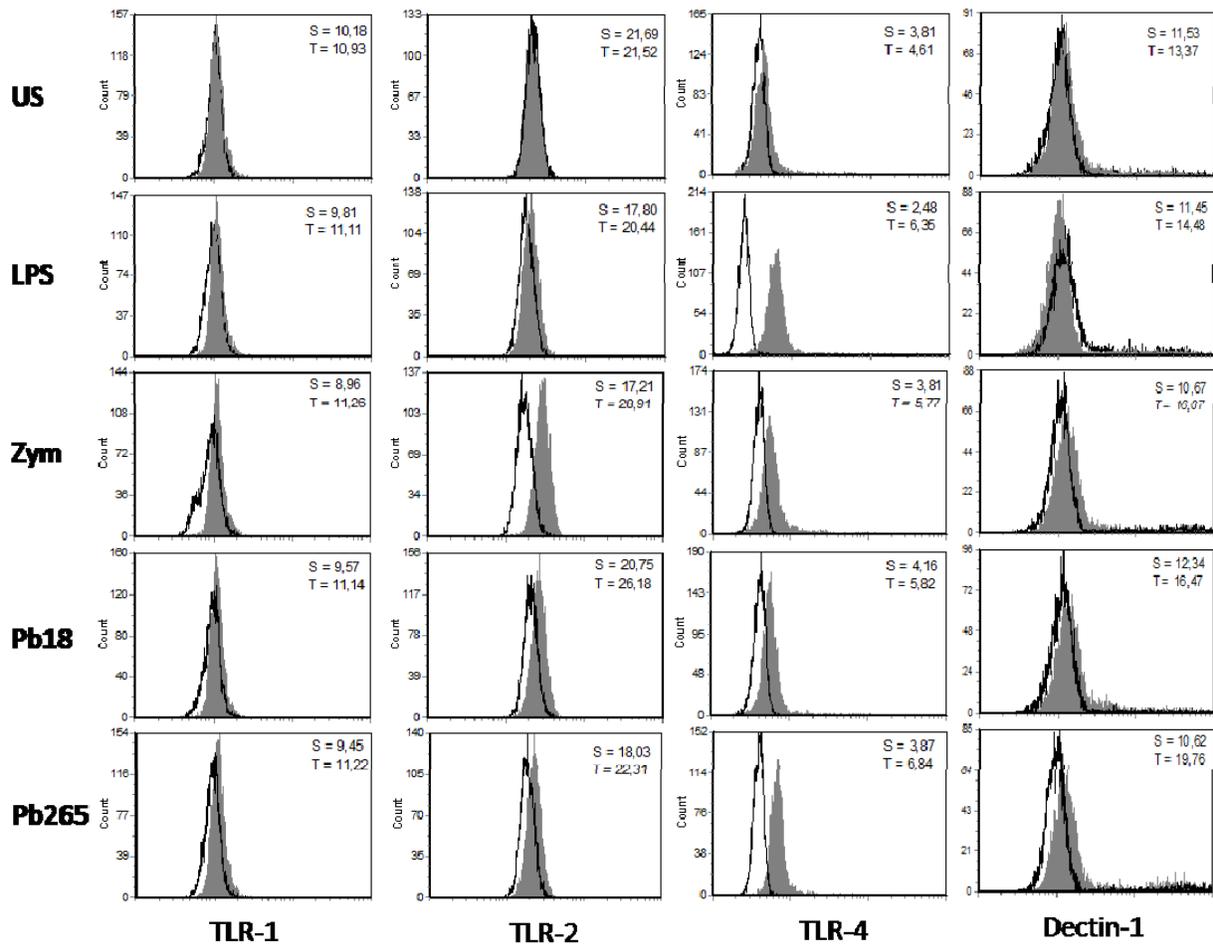


Figure 3. Representative histograms of one experiment showing surface (S) and total (T: surface + intracellular) expression of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and dectin-1 in monocytes from normal donors unstimulated (US) or stimulated for 30 minutes with LPS (10µg/mL), zymosan (10 µg/mL) or *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265).

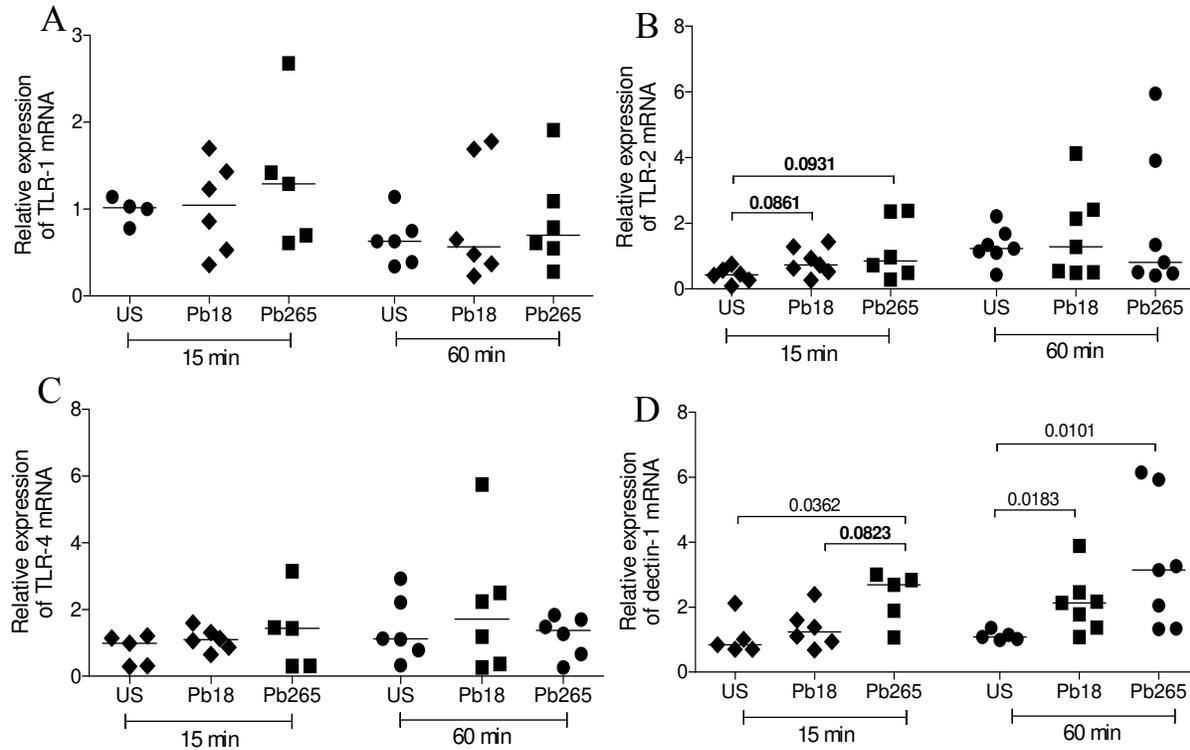


Figure 4. Relative expression of TLR-1 (A), TLR-2 (B), TLR-4 (C) and dectin-1 (D) mRNA in monocytes from normal donors unstimulated (US) or stimulated for 15 or 60 minutes with *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265). Values recorded were normalized according to the quantity of GAPDH and ubiquitin mRNA in each sample measured in the same RT-PCR run. Horizontal bars represent median. * $P < 0.05$, Kruskal-Wallis.

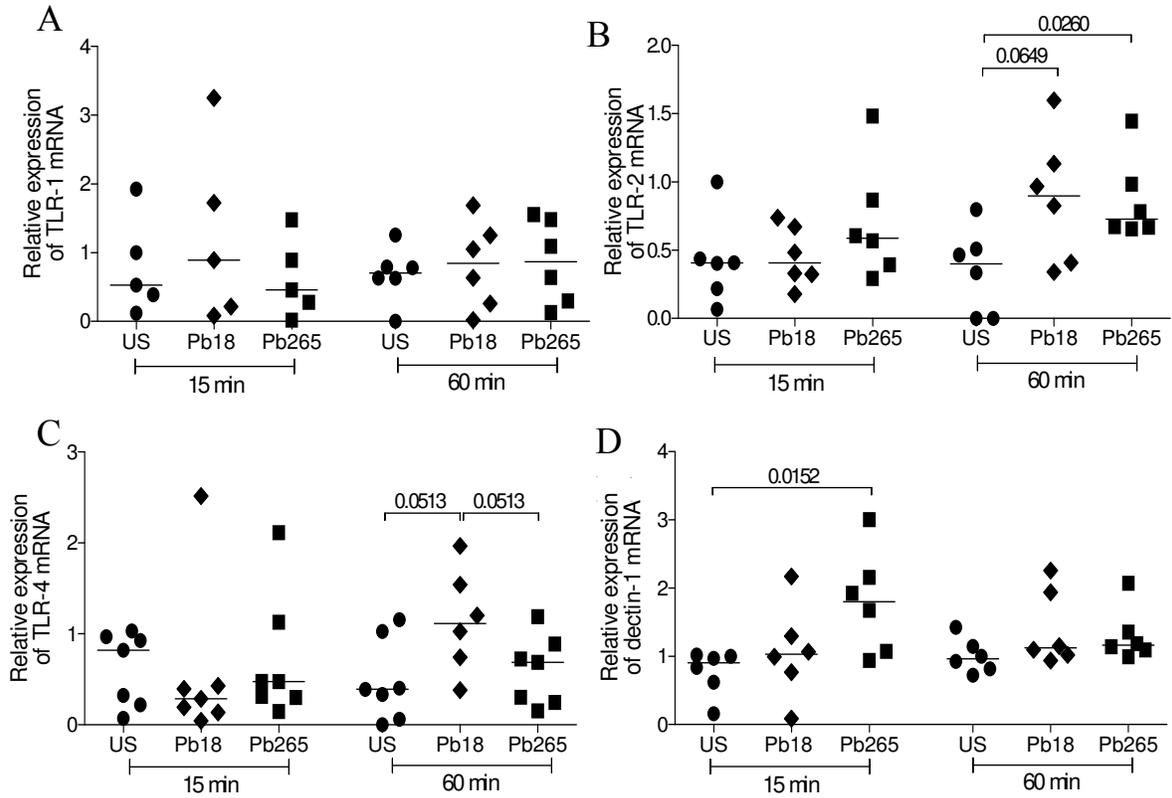


Figure 5. Relative expression of TLR-1 (A), TLR-2 (B), TLR-4 (C) and dectin-1 (D) mRNA in neutrophils from normal donors unstimulated (US) or stimulated for 15 or 60 minutes with *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265). Values recorded were normalized according to the quantity of GAPDH and ubiquitin mRNA in each sample measured in the same RT-PCR run. Horizontal bars represent median. * $P < 0.05$, Kruskal-Wallis.

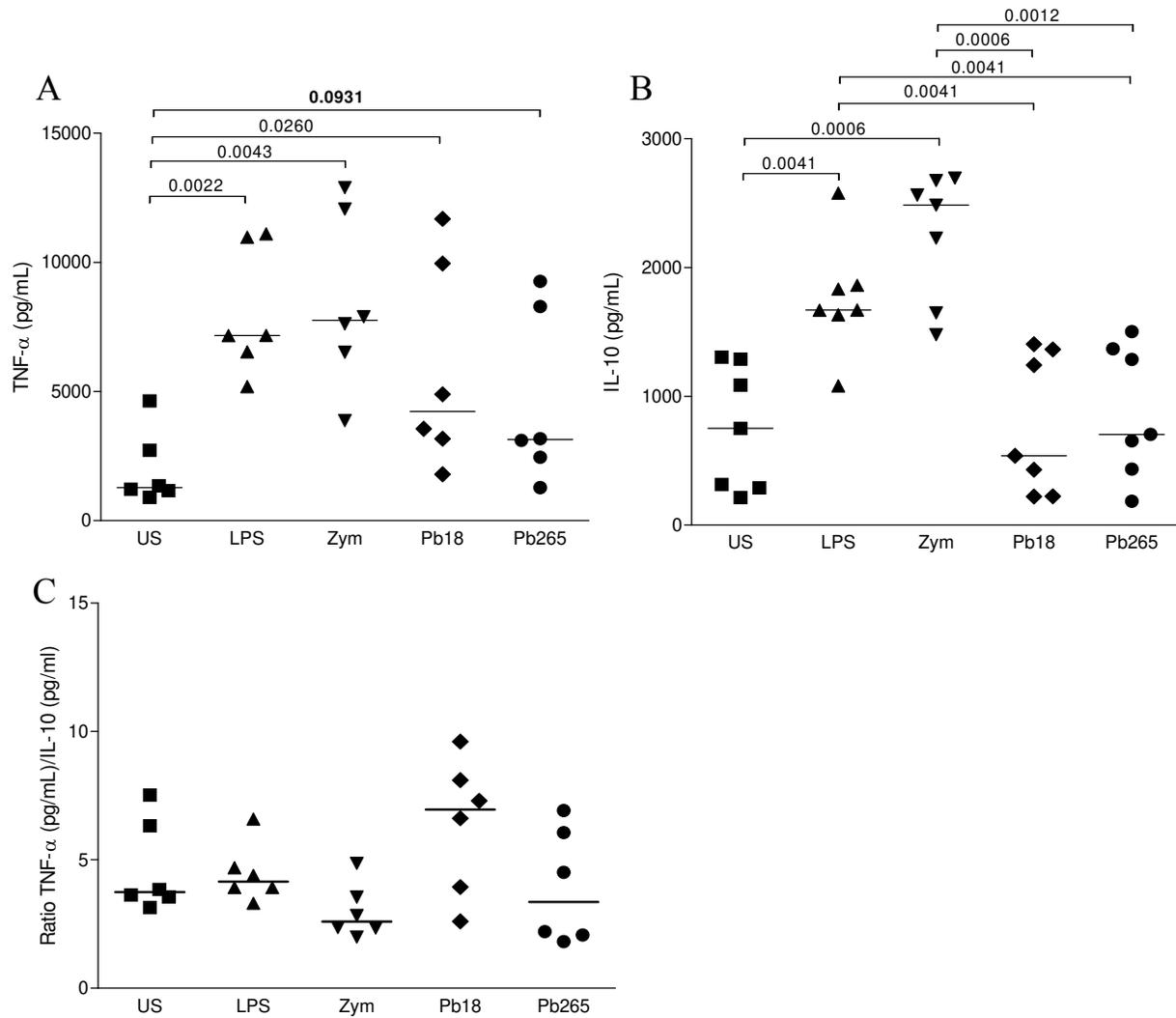


Figure 6. Levels of TNF- α (A) and IL-10 (B) in supernatants of monocytes from normal donors unstimulated (US) or stimulated with LPS (10 μ g/mL), zymosan (10 μ g/mL) or *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265) for 24h. C: TNF- α /IL-10. Horizontal bars represent median. *p<0.05, Kruskal-Wallis.

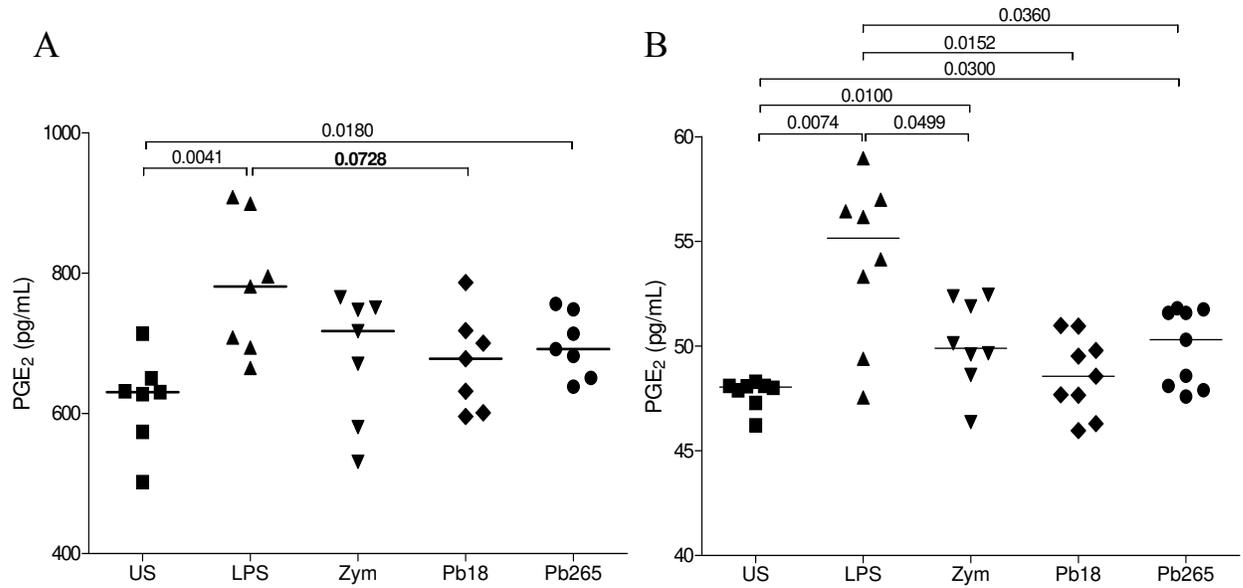


Figure 7. Prostaglandin E2 (PGE₂) detected in supernatants of monocytes (A) and neutrophils (B) from normal donors unstimulated (US) or stimulated for 24 h with LPS (10 μg/mL), zymosan (10 μg/mL) or *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 or Pb265). Horizontal bars represent median. *p<0.05, Kruskal-Wallis.