UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

Ana Claudia Paiva Alegre Maller

**Paracoccina Recombinante Reproduz as
Propriedades Biológicas da Lectina Nativa e Induz
Imunidade Protetora Contra a Infecção
por *Paracoccidioides brasiliensis***

Ribeirão Preto/SP

2014

Ana Claudia Paiva Alegre Maller

**Paracoccina Recombinante Reproduz as
Propriedades Biológicas da Lectina Nativa e Induz
Imunidade Protetora Contra a Infecção
por *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira.

Ribeirão Preto/SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que a fonte seja citada.

Catálogo da Publicação

Serviço de documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Alegre-Maller, Ana Claudia Paiva.

Paracoccina Recombinante Reproduz as Propriedades Biológicas da Lectina Nativa e Induz Imunidade Protetora Contra a Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* / Ana Claudia Paiva Alegre Maller; orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira. Ribeirão Preto, 2014.

161 p. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira.

Paracoccina Recombinante. 2. Imunidade Protetora. 3. Paracoccidioidomicose. 4. *Paracoccidioides brasiliensis*. 5. Receptores do tipo Toll. I. Paracoccina Recombinante Reproduz as Propriedades Biológicas da Lectina Nativa e Induz Imunidade Protetora Contra a Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. II. Roque-Barreira, Maria Cristina.

Dedico esta tese à Deus, aos meus pais queridos, ao meu esposo amado, a minha família linda e aos amigos companheiros, pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Nos agradecimentos recordamos os bons momentos vividos e as dificuldades superadas ao longo desse período. Muitas pessoas nos ajudaram a manter o equilíbrio necessário entre razão e emoção para desenvolver esse trabalho científico e por esta razão gostaria de agradecê-los. Talvez pouco signifique para os leitores, mas pra mim tudo foi muito importante e eu vou lembrar com saudades...

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira. Agradeço por toda a contribuição que a senhora de maneira brilhante me proporcionou durante o doutorado.

Aos professores Dra. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta, Dr. Márcio Lourenço Rodrigues, Dr. Roberto Martinez e Dr. Luiz Roberto Basso Júnior, pelo tempo dedicado a este trabalho e pelas valiosas sugestões para a redação final dessa tese.

À Darling (Sandra Maria de Oliveira Thomaz), agradeço pelo carinho, pelos momentos de alegria e claro, pelo cuidado com o laboratório e por toda a ajuda técnica.

À Flávia Costa Mendonça, passamos longos e bons momentos dentro da salinha de cultura. Agradeço a oportunidade de trabalharmos juntas.

Ao Rafael Ricci de Azevedo pelo bom convívio durante todos esses anos.

Ao Mateus Freitas, obrigada pela ajuda nos longos experimentos *in vitro* e pela companhia.

À Aline Oliveira, embora tenhamos passado momentos a vários quilômetros de distância, obrigada pela contribuição neste trabalho e pelos ensinamentos que me foram de grande valia.

Ao Ita, pelos ensinamentos e pela importante contribuição na obtenção da lectina recombinante.

Às minhas queridas amigas madrinhas Gabriela Morilha Zanaroti e Tatiane Ramos. Vocês são pessoas maravilhosas que eu tive a oportunidade de conhecer e que farão sempre parte da minha lembrança.

Ao Relber pelos momentos de descontração.

Ao Thiago Aparecido da Silva, pelos experimentos de infecção.

Ao Fausto, pela colaboração nos ensaios de atividade enzimática.

À Luciana Ruas, pelas discussões que enriqueceram o trabalho.

À Patrícia Vendrúsculo, pelo suporte técnico.

À secretária Érica Vendrúsculo pelo auxílio nas questões burocráticas.

À Aline Sardinha, André, Bruno, Camila, Carla, Fabrício, Fernanda, Marcel, Marina, Marise, Nerry, Vânia, pelos momentos compartilhados e pela ajuda.

À Karol e Amanda obrigada pelos bons momentos que tivemos em Ribeirão Preto.

À Gabriela Bunhotto Zamonier, pela ajuda, atenção e competência em seu trabalho.

À Camila Fabris e Lúcia Helena Picinato Raphael, pela ajuda e disponibilidade nos assuntos relacionados à secretaria.

À Maria Helena e Lúcia M. L. Silva, por permitirem a execução desse trabalho fornecendo materiais limpos e mantendo a limpeza do laboratório, além da agradável convivência no dia-a-dia.

Ao Domingos, por estar disponível em ajudar no cuidado com os animais.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa e auxílio técnico concedidos. Obrigada por contribuir com a minha formação profissional.

À Universidade de São Paulo, juntamente com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, pela oportunidade da Pós-Graduação.

À todos os professores que ajudaram na minha formação acadêmica.

Sem essas pessoas e outras tantas, que podem se considerar citadas, este trabalho não teria um final feliz.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Paracoccina (PCN) é um constituinte de *Paracoccidioides brasiliensis*, um patógeno humano que causa a paracoccidioidomicose, micose sistêmica mais prevalente na América Latina. A PCN é uma proteína de função dual, com domínios de atividade lectínica e de N-acetilglicosaminidase. Análises proteômicas da preparação paracoccina revelaram a sua correspondência com uma proteína hipotética de *P. brasiliensis* do isolado 18 (*Pb18*), anotada como PADG-3347.1, que tem sequência polipeptídica semelhante a família das endoquitinases 18. Essas endoquitinases apresentam domínios distintos de atividade lectínica e enzimática. O conjunto de *exons* do gene correspondente, PADG-3347.1, foi clonado e expresso em *E. coli*, e as características físicas e biológicas da proteína recombinante foram comparadas com as da PCN. Além disso, a PADG-03347.1 recombinante (rPCN) foi avaliada por suas propriedades imunomoduladoras e sua capacidade em conferir proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*. Nesse sentido, investigamos a interferência da administração profilática e terapêutica de rPCN no curso da infecção por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c. A histopatologia pulmonar dos camundongos tratados com a rPCN, mostrou menor ocorrência de granulomas, e estes também foram menores do que os observados nos animais controles. Consistente com a observação de poucas leveduras no centro dos granulomas, a contagem de UFC a partir do homogenato pulmonar dos camundongos tratados foi inferior ao observado nos animais controles. Além disso, a administração de rPCN, foi associada com altos níveis de IL-12, IFN- γ , TNF- α , NO e IL-10 detectados no homogenato pulmonar. Os altos níveis de citocinas produzidos nos animais tratados com rPCN nos levou a investigar a ocorrência de interação da lectina com receptores presentes em células da imunidade inata, tais como TLR2 e TLR4. Verificamos que a rPCN ativa TLR2, nas formas homo ou heterodimérica, e TLR4, de modo independente dos correceptores CD14 e CD36. Estes dados revelam um possível mecanismo pelo qual rPCN gera proteção nos camundongos contra a PCM. rPCN, administrada terapêutica ou profilaticamente, induz a ativação de TLRs e imunidade Th1, conferindo proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

Paracoccin is a constituent of *Paracoccidioides brasiliensis*, a human pathogen that causes paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Paracoccin is a dual function protein exerting lectin and *N*-acetylglucosaminidase activities. Proteomic analysis of paracoccin preparation revealed its correspondence with a hypothetical protein from *P. brasiliensis* isolate *Pb18* (*Pb18*), annotated as PADG-3347.1, which has a polypeptide sequence similar to the family 18 endochitinases. These endochitinases have distinct lectin and enzymatic domains. The multi-exon assembly of the correspondent gene (PADG-3347) was cloned and expressed in *E. coli*, and the physical and biological features of the recombinant protein were compared to those of the native paracoccin. Moreover, recombinant PADG-3347.1 (rPCN) was evaluated for its immunomodulatory properties and its ability to confer protection against murine *P. brasiliensis* infection. Thus, we investigated the interference of prophylactic and therapeutic administration of rPCN on the course of *P. brasiliensis* infection in BALB/c mice. The pulmonary histopathology of the treated mice showed lower incidence of granulomas, which were also smaller than those observed in the control animals. Consistently with the observation of few yeasts in the center of the granulomas, the CFU count provided by lung homogenates of treated mice was lower than the provided by control mice. Furthermore, administration of rPCN was associated with higher levels of IL-12, IFN- γ , TNF- α , NO and IL-10, detected in the lung homogenates of animals. The high levels of cytokines produced in the rPCN treated mice prompted us to investigate the occurrence of interaction of the lectin with receptors present in innate immune cells, such as TLR2 and TLR4. We verified that rPCN activates TLR2, in homo or heterodimeric forms, and TLR4, in a manner that does not depend on CD14 and CD36 coreceptors. These data reveal a possible mechanism by which rPCN generates protection in mice against PCM. rPCN, administered therapeutic or prophylactically, induces TLRs activation and Th1 immunity, conferring protection against *P. brasiliensis* infection,

LISTA DE ABREVIATURAS

A/Sn: camundongos resistentes à infecção com *P. brasiliensis*

APC: *antigen-presenting cell*

B10.A: camundongos susceptíveis a infecção com *P. brasiliensis*

BCA: *bicinchoninic acid assay*

BHI: *brain heart infusion*

BSA: *bovine serum albumin*

CO₂: gás carbônico

Con A: concanavalina A

CRD: *carbohydrate recognition domain*

DEMEM: *Dulbecco's modified Eagle's Medium*

DO: densidade óptica

EDTA: *Ethylene-diamine tetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme linked immuno sorbent assay*

FBS: *fetal bovine serum*

FSL-1: Pam2CGDPKHPKSF

GlcNAc: N-acetilglicosamina

GMS: *Grocott methenamine silver*

gp43: glicoproteína de peso molecular de 43 kDa.

HE: hematoxilina-eosina

HEK: *human embryonic kidney*

HSP: *heat shock protein*

IFN- γ : Interferon-gamma

IgY: *Immunoglobulin from egg-yolk*

IL: interleucina

iNOS: *inducible nitric oxide synthase*

IPTG: *isopropil- β -tiogalactopíranosídeo*

kDa: quilodaltos

kV: quilovolts

LB: Lúria-Bertani

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano

Min: minuto

MR: *mannose receptor*

I.v.: intravenosa

NAGase: N-acetilglicosaminidase

NEED: *N-1-Naphthyl-ethyl-enediamine dihydrochloride*

NO: *nitric oxide*

O/N: *overnight*

OPD: *phenylenediamine dihydrochloride*

P10: peptídeo 10 da glicoproteína 43 (gp43)

P3CSK4: Pam3Cys-SKKKK

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*

Pb18: isolado 18 de *P. brasiliensis*

PBS: *phosphate buffered saline*

PCM: paracoccidioidomicose

PCN: paracoccina

PHA: fitohemaglutinina

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PRR: *pattern-recognition receptors*

RLU: *relative light unit*

rPCN: paracoccina recombinante

S.c.: subcutaneamente

s: segundos

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE: *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*

TA: temperatura ambiente

rpm: rotações por minutos

TGF- β : *transforming growth factor beta.*

Th1: *T helper 1*

Th2: *T helper 2*

TLR: *Toll like receptor*

TMB: tetrametilbenzamidina

TNF- α : *tumor necrosis fator alpha*

UFC: unidades formadoras de colônia

WT: *wild type*

YPD: *yeast peptone dextrose*

p-NP-GlcNac: p-Nitrofenil-N-acetilglicosamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica das infecções fúngicas endêmicas na América Latina.....	22
Figura 2	Sinalização via receptores do tipo Toll (TLR) na indução de uma resposta inflamação e na ativação de mecanismos anti-inflamatórios.....	34
Figura 3	Estratégia para síntese do gene PADG_03347.....	40
Figura 4	rPCN foi expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE).....	58
Figura 5	Após o procedimento de <i>refolding</i> e purificação por afinidade a N-acetilglicosamina, rPCN foi reconhecida por anticorpos anti-PCN.....	59
Figura 6	Macrófagos elicitados produziram TNF- α e NO em resposta ao estímulo com rPCN.....	60
Figura 7	rCPN interagiu com laminina de maneira dependente de dose e do reconhecimento de açúcar.....	61
Figura 8	A rPCN foi dotada de atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase.....	62
Figura 9	Anticorpos anti-rPCN reconheceram a lectina na superfície de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	63
Figura 10	A administração da rPCN em regime profilático associou-se a redução de lesões pulmonares próprias da PCM.....	66
Figura 11	A administração de rPCN em regime terapêutico também associou-se à redução de lesões pulmonares próprias da PCM.....	67
Figura 12	O tratamento profilático ou terapêutico com rPCN resultou em redução da recuperação de leveduras do macerado pulmonar de animais no 30º dia de infecção com <i>P. brasiliensis</i>	69
Figura 13	Administração profilática ou terapêutica de rPCN associou-se a altos níveis de IL-12 no pulmão de camundongos com 30 dias de infecção com <i>P. brasiliensis</i>	71
Figura 14	Alguns protocolos de administração profilática e terapêutica de rPCN, associaram-se ao aumento dos níveis pulmonares de TNF- α e IFN- γ , em camundongos no 30º dia de infecção com <i>P. brasiliensis</i>	73
Figura 15	A administração profilática e terapêutica de rPCN associou-se ao aumento dos níveis pulmonares de óxido nítrico, em camundongos no 30º dia de infecção com <i>P. brasiliensis</i>	75

Figura 16	A administração da rPCN não interferiu nos níveis pulmonares de IL-4, mas associa-se ao aumento dos níveis de IL-10, no 30º dia de infecção com <i>P. brasiliensis</i>	77
Figura 17	rPCN ativou TLR2/1, TLR2/6 e TLR4 transfectados em células HEK293T.....	79
Figura 18	A ausência da co-transfecção de CD14 ou CD36 associada à transfecção de TLR2/1 ou tLR2/6, não comprometeu a ativação de tais receptores por rPCN.....	81
Figura 19	A homodimerização de TLR2 não comprometeu radicalmente a produção de IL-8 por rPCN.....	83
Figura 20	A glicana N-ligada ao quarto sítio de N-glicosilação do ectodomínio de TLR2 possivelmente foi alvo de reconhecimento por rPCN envolvido na ativação celular disparada pela interação de rPCN com TLR2.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos experimentais.....	48
Tabela 2	Plasmídeos do complexo TLR2.....	52

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS	15
Introdução	20
1.1. Paracoccidioidomicose	21
1.2. A imunologia da paracoccidioidomicose	24
1.3. Lectinas e imunomodulação	28
1.4. O envolvimento dos receptores do tipo Toll nas infecções fúngicas	32
Objetivos.....	36
2. Objetivo geral.....	37
Material e Métodos	38
3.1 Expressão e purificação do gene PADG_03347	39
3.1.1 <i>Análise da expressão protéica em E. coli.....</i>	<i>39</i>
3.1.2 <i>Purificação da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão</i>	<i>40</i>
3.1.3 <i>“Refolding” pelo método de diálise</i>	<i>41</i>
3.1.4 <i>Purificação da proteína recombinante em coluna de N-acetilglicosamina.....</i>	<i>41</i>
3.1.5 <i>Remoção de endotoxinas em coluna de Polimixina-B da preparação de proteína recombinante</i>	<i>41</i>
3.1.6 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	<i>42</i>

3.1.7	<i>Produção e purificação de anticorpos aviários</i>	42
3.1.7.1	O processo de imunização	42
3.1.7.2	Separação e purificação de IgY da gema de ovos	42
3.1.8	<i>Western blotting</i>	43
3.1.9	<i>Biotinilação da proteína recombinante</i>	43
3.1.10	<i>Ensaio de ligação a laminina e inibição por açúcar</i>	44
3.1.11	<i>Atividade imunobiológica da proteína recombinante</i>	44
3.1.11.1	Obtenção de macrófagos peritoneais murinos	44
3.1.11.2	Estimulação das células aderentes	45
3.1.11.3	Dosagem de TNF- α	45
3.1.11.4	Dosagem de óxido nítrico	45
3.1.12	<i>Dosagem da atividade enzimática de N-acetil-β-D-glicosaminidase</i>	46
3.1.13	<i>Deteção da PCN nas leveduras de P. brasiliensis</i>	46
3.1.14	<i>Animais</i>	47
3.1.15	<i>Cultivo de leveduras de P. brasiliensis</i>	47
3.1.16	<i>Administração da proteína recombinante (rPCN) ou do veículo</i>	47
3.1.17	<i>Infeção dos camundongos com leveduras de P. brasiliensis</i>	49
3.1.18	<i>Determinação da viabilidade dos fungos para infecção</i>	49
3.1.19	<i>Recuperação de leveduras a partir do pulmão dos animais infectados</i>	49
3.1.20	<i>Dosagem de IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF-α e IFN-γ a partir do sobrenadante do pulmão</i>	50
3.1.21	<i>Histologia a partir do tecido pulmonar</i>	51
3.1.22	<i>Morfometria dos granulomas</i>	51
3.1.23	<i>Plasmídeos utilizados na transfecção</i>	51
3.1.24	<i>Preparação dos plasmídeos utilizados nos ensaios de transfecção</i>	52
3.1.25	<i>Preparação das células</i>	52
3.1.26	<i>Eletroporação</i>	53
3.1.27	<i>Ligantes de TLRs</i>	53

3.1.28	<i>Transfecção transiente em HEK293T com os complexos de TLRs</i>	53
3.1.29	<i>Construção dos plasmídeos mutantes nos sítios glicosilados de TLR2</i>	54
3.1.30	<i>Transfecção dos plasmídeos mutantes dos sítios de glicosilação de TLR2 em células HEK 293T</i>	54
3.1.31	<i>Detecção de IL-8</i>	55
3.1.32	<i>Análise estatística dos resultados</i>	55
Resultados		56
4.1	<i>O produto do gene PADG_03347 foi expresso com sucesso por E. coli BL21 (DE)</i> ...	57
4.2	<i>A rPCN após o processo de refolding foi solubilizada, e anticorpos anti-PCN reconheceram a lectina recombinante</i>	58
4.3	<i>A rPCN foi capaz de induzir a produção de TNF-α e óxido nítrico em macrófagos murinos</i>	60
4.4	<i>A rPCN interagiu com laminina de maneira dependente do reconhecimento de carboidrato</i>	61
4.5	<i>rPCN foi dotada de atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase</i>	62
4.6	<i>Reconhecimento de leveduras de P. brasiliensis por anticorpos anti-rPCN</i>	62
4.7	<i>Análise da histologia pulmonar</i>	64
4.8	<i>A administração de rPCN reduziu a recuperação de células fúngicas (UFC) do pulmão de camundongos infectados por P. brasiliensis</i>	68
4.9	<i>A administração de rPCN associou-se a níveis aumentados de IL-12 em camundongos infectados com P. brasiliensis</i>	70
4.10	<i>A administração de rPCN associou-se a níveis aumentados de TNF-α e IFN-γ em camundongos infectados com P. brasiliensis</i>	72
4.11	<i>A administração de rPCN associou-se a níveis aumentados de óxido nítrico em camundongos infectados com P. brasiliensis</i>	74
4.12	<i>Níveis pulmonares de IL-4 e IL-10 em camundongos aos quais rPCN foi administrada em regime profilático ou terapêutico, detectados aos 30 dias de infecção com P. brasiliensis</i>	76

4.13	<i>A rPCN ativou diretamente TLRs.....</i>	78
4.14	<i>A ativação de TLR2/1 e TLR2/6 por rPCN não foi dependente das moléculas acessórias CD14 e CD36</i>	80
4.15	<i>A falta de heterodimerização de TLR2 não comprometeu a ativação desencadeada por rPCN</i>	82
4.16	<i>A ativação de TLR2 por rPCN possivelmente foi dependente das glicosilações presentes no ectodomínio desse receptor</i>	84
	Discussão	86
	Conclusões	96
	Referências Bibliográficas	98
	Anexo I.....	114
	Anexo II	142

Introdução

1.1. Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) foi primeiramente relatada por Adolf Lutz em 1908, no Brasil. Lutz verificou em lesões orais de alguns indivíduos a existência de fungo de natureza dimórfica, com características distintas às do *Coccidioides immitis*, que já era conhecido na ocasião (Marques et al., 2012). Em 1911, Alfonse Splendore relatou novos casos semelhantes e descreveu detalhes do crescimento do fungo em cultura; propôs a nomenclatura de *Zymonema brasiliense*. Somente em 1930, Floriano de Almeida, utilizando-se de aspectos morfológicos e de características da doença provocada em animais de laboratório, fez a distinção entre o agente em questão e o *C. immitis*, propondo a denominação *Paracoccidioides brasiliensis*. A partir de então, a doença passou a ser conhecida como doença de Lutz-Splendore-Almeida e, posteriormente, como blastomicose sul-americana. A partir de 1971 o termo paracoccidioidomicose foi adotado para nominar a doença (Marques et al., 2012).

A PCM é uma micose sistêmica agudo-crônica, relatada como autóctone da América Latina, cuja incidência se estende do sul do México ao norte da Argentina (Marques et al., 2012). É prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina, com distribuição não homogênea; os casos se concentram em regiões tropicais e subtropicais, onde florestas são abundantes, há altos índices pluviométricos (superiores a 1.400 mm ao ano) e temperaturas moderadas (na faixa de 17°C a 24°C) (Restrepo et al., 2001; Sifuentes-Osornio et al., 2012), figura 1. O Brasil é o país de maior incidência de PCM, respondendo por 85% de todos os casos relatados; a doença é endêmica nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país (Restrepo et al., 1985; Verli et al., 2005). Em 1985, Ajello e Polonelli chamaram a atenção para o fato de que a PCM pudesse se tornar um problema de saúde pública em países nos quais a doença não é endêmica. Desde então, houve um aumento da frequência de relatos de casos clínicos nos Estados Unidos, Europa e Japão. No Japão, 18 casos foram relatados e a maioria desses pacientes vivera por anos em áreas endêmicas do Brasil (Miyaji e Kamei, 2003; Onda et al., 2011). Outras ocorrências de casos de PCM foram relatadas na Espanha (9 casos) (Buitrago et al., 2011; Botas-Velasco et al., 2010), Holanda, Alemanha (Van Damme et al., 2006; Horré et al., 2002), Áustria (Mayr et al., 2004), França, Itália (Bousquet et al., 2007; Ajello e Polonelli, 1985) e Guiana Francesa (Sarazin et al., 2005). Possivelmente, esses casos estão associados ao aumento da frequência de viagens internacionais, do ecoturismo e da emigração (Kamei et al., 2003 e Buitrago et al., 2011). Em áreas não endêmicas é possível

que o diagnóstico da doença só se faça tardiamente, pela falta de experiência dos médicos locais e a semelhança clínica da PCM pulmonar com tuberculose e sarcoidose, o que resulta em evolução silenciosa da PCM (Kamei et al., 2003 e Buitrago et al., 2011). Ademais, o longo período de latência da infecção pode dificultar a inclusão da PCM nas hipóteses diagnósticas (Buitrago et al., 2011).

Figura 1. Distribuição geográfica das infecções fúngicas endêmicas na América Latina (Adaptado de Sifuentes-Osornio et al., 2012).

A associação de PCM com outras doenças tem sido estudada. Dentre pacientes acometidos por AIDS no Brasil, a PCM é a quinta causa de morte causada por infecções intercorrentes, respondendo por 1,4 % das mortes causadas por micoses sistêmicas, dentre as

quais a criptococose é a mais frequente, causando 50,9 % das mortes (Prado et al., 2009). Já a associação entre PCM e câncer é incomum, mas não rara. Observações feitas na região sul do Brasil, mostram que a prevalência de câncer de pulmão é significativamente mais alta entre fumantes com PCM, do que entre fumantes não acometidos de PCM, sugerindo que a micose aumente o risco para o desenvolvimento de câncer pulmonar (Rodrigues et al., 2010).

O perfil típico de indivíduos acometidos pela PCM corresponde ao de homens com idade na faixa de 30 a 50 anos (Kwon-Chung et al., 1992; Wanke e Aidê, 2009), de baixo nível sócio-econômico, apresentando desnutrição e alcoolismo crônico, fatores estes que interferem na evolução da doença (Lacaz et al., 2002) adulto. Frequentemente os pacientes provêm de áreas rurais e estão envolvidos com o manejo do solo e de plantações contaminadas com partículas fúngicas (Marques et al., 2012).

A doença se caracteriza pelo comprometimento pulmonar, podendo se disseminar para outros órgãos e sistemas (Kwon-Chung et al., 1992). O agente etiológico da PCM, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, pertence ao filo Ascomycota, ordem Oxygenales e família Onygenaceae, que também inclui *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, e *Lacazia loboi*. Esses fungos compartilham o termodimorfismo (Bagagli et al., 2008), característica que permite a alternância entre hifas (forma infectante) e leveduras (forma patogênica) (San-Blas et al., 2002). A parede celular do *P. brasiliensis* associa-se diretamente às mudanças morfogênicas que ocorrem na fase de transição e exerce papel essencial na patobiologia do fungo (Castro et al., 2009).

A infecção por *P. brasiliensis* ocorre essencialmente pela inalação de artroconídeos (pequenos fragmentos miceliares), que se transformam em levedura patogênica depois de atingirem o epitélio alveolar pulmonar (Brummer et al., 1993; Restrepo-Moreno, 1993). No pulmão, uma série de genes responsáveis pela transformação da forma infectante em patogênica são ativados, sob estímulo principal da temperatura corporal do hospedeiro (San-Blas and San-Blas, 1984; McEwen et al., 1987). A partir daí, o fungo pode ser eliminado por células imunocompetentes ou infectar o pulmão, chegando a se disseminar para outros tecidos através das vias linfática e hematogênica. Esse quadro resulta em ampla gama de manifestações clínicas e imunológicas, que varia desde formas assintomáticas, passando por formas benignas e localizadas, até formas graves e disseminadas (Borges-Walmsley et al., 2002). Essas formas graves respondem pelo fato de, no Brasil, a PCM ser uma importante causa de morte: a principal por micose sistêmica em pacientes não imunosuprimidos e a décima dentre as doenças infecciosas e parasitárias (Marques et al., 2012).

O amplo espectro de manifestações clínicas da PCM levou a propostas de diversas classificações da doença, geralmente elaboradas com base nos órgãos e/ou sistemas afetados. Desde 1987 existe uma classificação que se tornou referência para a doença, delineada pelos critérios a seguir sumarizados:

1. PCM Infecção: subclínica, positivamente detectada no teste de pele.

2. PCM Doença:

- 2.1 Forma aguda ou subaguda: acomete geralmente pacientes jovens, de ambos os sexos; o sistema reticuloendotelial é afetado. Ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes no sudeste do Brasil.

- 2.2 Forma crônica: acomete adultos do sexo masculino. Pode ser unifocal (um único órgão é afetado, geralmente os pulmões) ou multifocal (afeta principalmente os pulmões e a mucosa oral).

3. Sequelas em decorrência da PCM: geralmente doença pulmonar obstrutiva crônica, disfonia e cicatrizes na laringe (Franco et al., 1987).

A resposta imunitária desenvolvida pelo indivíduo infectado é a principal responsável pelo espectro de manifestações clínicas e patológicas da PCM. Sabe-se que pacientes com PCM frequentemente têm imunidade celular deprimida (Brummer et al., 1993; Benard et al., 1997; Benard et al., 2001; Campanelli et al., 2003). Estudos clássicos demonstraram que formas benignas da doença estão associadas a baixos níveis de anticorpos específicos e reações de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) positivas (Franco et al., 1989). Por outro lado, a resistência a infecções fúngicas é atribuível à imunidade mediada por células *T helper* 1 (Th1), que se desenvolvem a partir do estímulo por IL-12 e produzem, caracteristicamente, altos níveis de IFN- γ . Já a susceptibilidade associa-se a respostas do tipo Th2, que cursam com a produção de IL-4, IL-5, TGF β e IL-10 (Calich et al., 1998; Cano et al., 1998; Peraçoli et al., 2003; Souto et al., 2000; Livonesi et al., 2009). Além da imunidade, fatores ligados ao fungo podem ter influência sobre as manifestações clínicas, como as características genéticas do organismo infectante, a carga fúngica e a virulência desse organismo (McEwen et al., 1987; Restrepo et al., 1985).

1.2. A imunologia da paracoccidiodomicose

O estabelecimento da doença, sua propagação e gravidade dependem de fatores inerentes ao fungo, tais como virulência da cepa infectante, volume do inóculo, a composição

antigénica, e especialmente das citocinas que serão produzidas durante o contato inicial entre o fungo e as células fagocitárias (Bernard, 2008).

Vários mecanismos da imunidade inata, tais como a ativação de proteínas do sistema complemento, a atividade microbicida das células *natural killer* (NK) e a fagocitose, atuam de forma significativa contra fungos patogênicos. Nos tecidos, os fagócitos exercem papel central na defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis* (Traynor e Huffnagle, 2001). Os primeiros estudos histopatológicos da PCM já sugeriam que as interações iniciais de *P. brasiliensis* com o hospedeiro são estabelecidas através das células fagocíticas. Em modelos experimentais de PCM, a resposta inicial, visualizada no animal infectado, é caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos em sítios de localização de células fúngicas (Bedoya et al., 1986; Iabuki & Montenegro, 1979; McEwen et al., 1987). A maioria dos estudos sobre o papel de neutrófilos na PCM demonstrou o exercício de uma importante atividade fungistática; atividade que é potencializada por IFN- γ , e pode ser relevante na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis* (McEwen et al., 1987; Restrepo e Velez, 1975; Kurita et al., 1999). Fagócitos mononucleares não ativados são permissivos à multiplicação fúngica, fato manifesto pelo achado de leveduras intactas no fagossomo dessas células (Brummer et al., 1999). A partir do estímulo com IFN- γ , fagócitos passam a ser dotadas de potente atividade fungicida (Brummer et al., 1988). A importância dos fagócitos no controle da infecção também foi experimentalmente reforçada a partir da identificação e utilização de linhagens de camundongos resistente (A/Sn) e susceptível (B10.A) à infecção por *P. brasiliensis*. Os camundongos A/Sn infectados apresentaram intenso infiltrado de neutrófilos e macrófagos nas áreas de grande destruição de células fúngicas. Já os camundongos B10.A infectados apresentaram múltiplas lesões, com pequeno encapsulamento e sem evidência de destruição fúngica (Xidieh et al., 1997).

A interação de moléculas presentes na superfície do fungo com receptores presentes na membrana das células fagocíticas, modula a fagocitose e promove a ativação dessas células, induzindo sinais que levam a expressão de genes da imunidade inata, e na produção de citocinas com propriedades pró e anti-inflamatórias, que regulam a resposta adaptativa (Mcinturff et al., 2005). A resposta imune celular está envolvida na defesa do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis*, determinando a gravidade e as formas clínicas da doença. Os modelos experimentais têm mostrado claramente que a resistência a PCM está associada ao desenvolvimento de uma resposta imunológica Th1, com produção de IFN- γ e TNF- α , enquanto que a susceptibilidade está associada a baixos níveis dessas citocinas,

associados à significativa produção IL-5 e IL-10 (Calich et al., 1998; Kashino et al., 2000). No homem, a resistência a PCM também tem sido atribuída às células T produtoras de IFN- γ (Calvi et al., 2003). Os estudos mostram que camundongos resistentes apresentam baixa carga fúngica na maioria dos órgãos e a infecção tende a ser resolvida por uma resposta mediada por um fenótipo celular dominante Th1; há intensa produção de IFN- γ , TNF- α , e NO, produção que se correlaciona diretamente com a atividade fungicida de macrófagos (Nathan, 1987). Além disso, IFN- γ estimula macrófagos infectados a secretarem TNF- α , citocina necessária para a formação e manutenção de granulomas compactos (Souto et al., 2000). O efeito sinérgico entre IFN- γ e TNF- α é essencial na resistência do hospedeiro e no desenvolvimento de uma atividade fungicida eficaz contra *P. brasiliensis* (Calvi et al., 2003; Soares et al., 2001).

As reações granulomatosas, predominantes na PCM humana e experimental, desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro frente à infecção fúngica. Os granulomas são formados por matriz extracelular organizada e por células fagocíticas mononucleares, que sofrem transformação para células epitelióides e gigantes multinucleares (Kerr et al., 1988), além de linfócitos T e de outros tipos celulares (Moscardi-Bacchi et al., 1989). Células dendríticas também se dispõem em torno do granuloma e colaboram com a produção de TNF- α , demonstrando que essa citocina esteja precocemente envolvida na infecção, logo após o contato do fungo com o hospedeiro (Pagliari e Sotto, 2003). TNF- α e IFN- γ contribuem crucialmente para o controle da infecção, por estimularem a formação de granulomas e a produção de NO. A infecção com *P. brasiliensis* de animais deficientes dessas citocinas resulta em comprometimento de reações granulomatosas, cujo desenvolvimento é necessário para conter as células fúngicas (Souto et al., 2000). Cano e colaboradores, em 1998, verificaram que tanto camundongos resistentes, como os susceptíveis à PCM, quando submetidos à depleção de IFN- γ por anticorpos monoclonais, apresentam granulomas coalescentes e destruição da arquitetura pulmonar; isso indica que, independentemente da linhagem utilizada, IFN- γ favorece a resposta protetora, sendo um dos principais mediadores na resistência contra a infecção por *P. brasiliensis*. Essa idéia foi reforçada pela observação de Souto et al. (2000) de que animais deficientes de IFN- γ (GKO) e infectados com *P. brasiliensis* sucumbem à infecção em 15 dias. Adicionalmente, a ausência de TNF- α resulta em comprometimento dos mecanismos de defesa associados à incapacidade em desenvolver reações granulomatosas eficazes para conter a multiplicação dos fungos (Souto et al., 2000). Em pacientes com PCM, verificou-se que nas regiões de lesões

granulomatosas de pele e mucosas, TNF- α é difusamente distribuída na derme; a citocina é expressa por células mononucleares que infiltram a região em torno do granuloma, ajudando na formação e manutenção do mesmo (Parise-Fortes et al., 2006).

A expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , por pacientes com a forma aguda da doença, está associada a mecanismos de evasão do fungo da resposta imune do hospedeiro, contribuindo para a disseminação da PCM (Neworal et al., 2003). A detecção de IL-10 e IL-5 em granulomas frouxos de pacientes com PCM indica que a imunidade desenvolvida não é eficaz na contenção da infecção fúngica (Pagliari e Souto, 2003; Pagliari et al., 2006). Nas formas mucocutâneas da PCM, a presença de TGF- β em áreas de fibrose após o tratamento com drogas anti-fúngicas sugere que esta citocina esteja envolvida no processo de cicatrização, por estimular a proliferação de fibroblastos. Se o fungo induzir precocemente a síntese de citocinas com atividades supressora ou anti-inflamatória, o resultado pode ser a supressão da resposta por macrófagos, permitindo a instalação e reprodução do fungo nos tecidos, além de sua disseminação para vários órgãos e sistemas (Bernard, 2008).

Pacientes com a forma crônica da doença, de gravidade moderada, apresentam resposta imune balanceada entre os padrões Th1 e Th2. Por outro lado, indivíduos infectados com *P. brasiliensis*, que vivem em áreas endêmicas e não desenvolvem doença mostram um padrão de resposta Th1, que suprime a replicação do fungo e mantém o equilíbrio fungo-hospedeiro (Mamoni e Blotta, 2005). Indivíduos saudáveis que entram em contato com o fungo resolvem a infecção no local do inóculo, através de imunidade inata eficiente e desenvolvimento de resposta de padrão Th1, com a formação de granulomas densos e organizados (Bernard, 2008).

A resposta Th2 associa-se à produção de IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que estimulam linfócitos B a produzirem imunoglobulinas, que, além de não serem protetoras, inibem as funções dos macrófagos e a diferenciação das células Th1 (Calich & Kashino, 1998). A resposta humoral não é responsável pela resistência a *P. brasiliensis*; tanto pacientes (Bernard et al., 1997) como camundongos susceptíveis infectados (Calich & Kashino, 1998) apresentam altos títulos de anticorpos séricos, atribuídos à ativação policlonal de linfócitos B, fenômeno característico da infecção crônica. A PCM se associa a hipergamaglobulinemia, aumento dos níveis de complexos imunes circulantes e ativação do sistema complemento pela via clássica (Arango e Yarzabal, 1982; Munk et al., 1992). Altos níveis séricos de IgG4, IgE e IgA (Arrango e Yarzabal, 1982) correlacionam-se diretamente com a gravidade da doença.

Embora a resposta humoral não tenha um importante papel de proteção na PCM, a presença de anticorpos específicos contra antígenos de *P. brasiliensis* é útil para o diagnóstico clínico da infecção, assim como para o acompanhamento de pacientes em tratamento, uma vez que a eficiência da terapia é avaliada pela queda no título desses anticorpos (Belissimo-Rodrigues et al., 2011; De Camargo et al., 2008; Borges-Wasmlsley et al., 2002; Del Negro et al., 2000).

A interação de componentes da parede celular fúngica com receptores presentes em células da imunidade inata induz a produção de citocinas, as quais ativam mecanismos de defesa que culminam na eliminação do fungo e na regulação da intensidade da reação granulomatosa; desta forma, danos teciduais são evitados. Por outro lado, as citocinas produzidas no contato inicial entre o fungo e as células fagocíticas podem favorecer o crescimento do patógeno e levar a disseminação e progressão da doença. Observou-se que a infecção de monócitos pré-incubados com IL-6 resulta em maior recuperação de células fúngicas, em comparação com a infecção de células que não foram pré-tratadas com a citocina. Esse pré-tratamento dos monócitos com IL-6 inibe a produção de TNF- α e IL-10, bem como exerce um efeito autócrino sobre a produção de IL-6. Estes resultados sugerem que IL-6, ao exercer um efeito modulador na produção de citocinas, torna os monócitos mais permissivos ao crescimento do fungo (Siqueira et al., 2009).

1.3. Lectinas e imunomodulação

Lectinas são proteínas que possuem no mínimo um sítio não catalítico capaz de se ligar de modo específico e reversível a um mono ou oligossacarídeo (Peumans e Van Damme, 1995). O primeiro relato na literatura de lectinas foi feito por Stillmark em 1888, quando ele observou a capacidade do extrato de sementes de *Ricinus communis* em aglutinar hemácias de diferentes espécies animais (Rudiger e Gabius, 2001).

A capacidade de ligação a carboidratos das lectinas é atribuída a um segmento polipeptídico designado “domínio de reconhecimento de carboidrato” (CRD) (Drickamer, 1988). A primeira evidência que lectinas se ligavam a carboidratos, foi obtida por Sumner e Howell em 1936, ao verificarem que a hemaglutinação promovida por Concanavalina A (Con A) era inibida na presença de sacarose.

A primeira demonstração da interação de lectina com células da imunidade foi feita com a fitohemaglutinina (PHA), ao se verificar sua capacidade em estimular a proliferação de linfócitos humanos (Nowell, 1960). Essa capacidade linfoproliferativa também foi

reproduzida por Con A, atuando sobre linfócitos murinos. Lectinas são capazes de exercer atividades biológicas diversas, como o estabelecimento da interação célula-célula, desencadeamento de eventos da imunidade inata, estímulo ao desenvolvimento de certas populações de linfócitos, indução na migração de leucócitos e promoção da adesão de patógenos a células hospedeiras (revisto por Sharon e Lis, 2004).

ArtinM, uma lectina isolada da semente de *Artocarpus heterophyllus*, liga-se especificamente ao trimanosídeo Man α 1-3 [Man α 1-6] Man, que constitui o *core* de N-glicanas. A afinidade por N-glicanas é aumentada pelo reconhecimento de resíduos adicionais de açúcar (como fucose e N-acetilglicosamina) através de um sítio secundário de interação, contido no CRD, fato que justifica sua seletividade de ligação a certas N-glicanas alongadas pela adição dos resíduos mencionados. ArtinM exerce relevantes atividades sobre células do sistema imune, que se refletem em modulação da resposta a infecções, que favorecem a resistência a patógenos intracelulares. A primeira observação da atividade imunomoduladora de ArtinM, foi a capacidade de induzir a produção de IL-12 em macrófagos murinos. A produção dessa citocina promoveu um *switch* na resposta imune de camundongos BALB/c de Th2 para Th1, mediando a resposta imune contra *L. major*. Tal produção foi dependente do CRD da lectina, uma vez que foi inibida seletivamente por D-manose (Panunto-Castelo et al., 2001). Também se observou a indução de IL-12 em células dendríticas, levando a produção de IFN- γ , e estabelecendo uma resposta imune do tipo Th1 (Panunto-Castelo et al., 2001; Teixeira et al., 2006). A imunomodulação desencadeada por ArtinM atribui-se ao reconhecimento de N-glicanas associadas a molécula de TLR2 (Coltri et al., 2008). Trabalhos tem mostrado que a administração de ArtinM confere proteção a camundongos infectados por diferentes patógenos intracelulares, como *P. brasiliensis*, *Neospora caninum*, *Candida albicans*, *Leishmania amazonensis* e *L. major*, em decorrência da indução de imunidade Th1 e Th17 (Panunto-Castelo et al., 2001; Teixeira et al., 2006; Coltri et al., 2010; Cardoso et al., 2011; Ruas et al., 2012).

De forma semelhante às lectinas de plantas, lectinas derivadas de patógenos também podem ter efeito imunomodulador. Um exemplo são as proteínas de micronema de *Toxoplasma gondii* TgMIC1 e TgMIC4 que tem especificidade por ácido siálico e galactose, respectivamente. A capacidade de ligação a esses açúcares permite a interação com glicanas de TLR2 e TLR4 expressos na superfície de macrófagos e células dendríticas, promovendo a ativação dessas células. Macrófagos de camundongos saudáveis ao serem estimulados com TgMIC1, TgMIC4 ou com a associação das duas lectinas, produzem óxido nítrico, citocinas

pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL12 (p40) e IL-1 β , além de aumentar a capacidade migratória, indicando a ocorrência de ativação celular. Ensaios realizados com macrófagos obtidos de animais TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} evidenciaram a notável dependência de TLR4 no efeito imunomodulador de TgMIC1 e TgMIC4. Além disso, a capacidade fagocítica dos macrófagos foi prejudicada na ausência de TLR4.

Nosso grupo de pesquisa identificou uma lectina de *P. brasiliensis* tanto no extrato como no sobrenadante de cultura de leveduras. Essa lectina foi denominada como paracoccina (PCN) e se liga reversível e especificamente a N-acetilglicosamina (GlcNAc) (Coltri et al., 2006). Utilizando-se soro de camundongo anti-PCN, verificou-se, através de microscopia confocal, que a lectina distribui-se no citoplasma e na superfície de leveduras, onde predomina nas regiões de brotamento (Coltri et al., 2006). Em micélios, foi demonstrada a presença predominante de PCN na extremidade das hifas (Mariano, 2007), local de crescimento dessas formas filamentosas, que ocorre por extensão apical (Harris e Momany, 2004; Gow e Gadd, 1995). Esses fatos indicam a importância da lectina no crescimento fúngico, idéia que já havia sido sugerida pela observação de que a adição de anticorpos anti-PCN ao meio de cultura da levedura, levou a uma redução no número das unidades formadoras de colônia (UFC) em 50,6%; além das colônias apresentarem tamanho reduzido e alteração no padrão de distribuição de quitina na parede fúngica (Ganiko et al., 2007). Coltri et al., 2006, verificaram que a PCN liga-se, de maneira dose-dependente, à laminina, glicoproteína da matriz extracelular, propriedade que pode contribuir para a adesão do fungo à matriz extracelular e favorecer a invasão de tecidos do hospedeiro, corroborando com a proposta do envolvimento dessa lectina no mecanismo de patogenicidade do fungo. Tal interação provavelmente acontece via CRD, uma vez que a adição do açúcar específico inibe parcialmente a ligação de PCN à laminina (Coltri et al., 2006). A lectina também foi capaz de induzir macrófagos de animais saudáveis a produzirem TNF- α e altas concentrações de NO (Coltri et al., 2006).

Estudos funcionais e proteômicos demonstraram que, além de um domínio lectínico, a PCN possui um sítio catalítico, com atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase. Levando em consideração a estrutura de multi-domínios da PCN, e sua bifuncionalidade, é possível propor que essa lectina atue não só nas células da imunidade do hospedeiro, mas também desempenhe funções relacionadas à remodelagem da parede celular em resposta a estímulos externos e ao crescimento fúngico, tanto de hifas como de leveduras (dos Reis Almeida et al.,

2010). PCN tem demonstrado ser uma lectina com um importante papel na biologia e na patogenicidade de *P. brasiliensis*.

Atualmente o tratamento de micoses sistêmicas é feito com antifúngicos sistêmicos e, em casos de pacientes imuno-deprimidos, as leveduras de *P. brasiliensis* se replicam intensamente devido à deficiência de uma resposta da imunidade inata e adaptativa. Diante dessas condições, o tratamento é pouco eficiente, não havendo nenhuma garantia que, ao final, haja completa eliminação do fungo. Além disso, são necessários longos períodos de tratamento e ainda assim, enfrentar uma frequência importante de recorrência da doença. Esse fato motivou a proposta de uma vacina terapêutica com antígenos do próprio fungo, capaz de induzir eficiente resposta imune celular e de evitar a recorrência da doença (Travassos et al., 2008).

A literatura recente é farta em demonstrações de que moléculas imunomoduladoras são de grande interesse, uma vez que elas são capazes de modular o sistema imunológico, a fim de amplificar uma resposta eficaz contra certos patógenos, especialmente os de parasitismo intracelular. As *heat shock protein* (HSP) têm sido bem caracterizadas como imunomoduladores, uma vez que estão associadas a diferentes fenômenos da imunidade inata e adaptativa (Segal et al., 2006). Membros dessa família de proteínas estão sendo testadas na profilaxia e/ou imunoterapia de tumores, doenças auto-imunes e micoses.

Moléculas como o DNA hsp 65, também vem sendo testadas em modelo murinos de PCM como fatores imunomoduladores. Os experimentos mostraram que a imunização com DNA hsp 65 induziu resposta Th1 que foi associada à redução da carga fúngica pulmonar. Estes resultados indicam que o DNA hsp 65 seja uma molécula promissora como adjuvante no tratamento da PCM (Ribeiro et al., 2009).

Os efeitos do peptídeo P10, derivado do antígeno diagnóstico para *P. brasiliensis* a glicoproteína gp43, também foram testados em associação aos antifúngicos. Os resultados mostraram que o tratamento realizado pela associação do peptídeo P10 com drogas antifúngicas apresentou efeito protetor adicional aos animais infectados com *Pb18*, ajudando na diminuição da carga fúngica até mesmo em animais imunossuprimidos. Os dados experimentais obtidos sugerem que uma vacina baseada no peptídeo P10 pode ser usada a fim de melhorar a quimioterapia, reduzir o tempo de tratamento e ajudar a evitar uma doença recorrente (Marques et al., 2006).

Embora o tratamento com as drogas anti-fúngicas tenha o papel principal de reduzir a carga fúngica nas infecções micóticas, o controle da doença a longo prazo e a eventual

esterilização do paciente, envolve uma resposta imune efetiva. Desta forma, a combinação do anti-fúngico com uma vacina eficaz contra a PCM, idealmente irá tratar os casos mais graves da doença, visando um menor período de tratamento, prevenção de recaídas e diminuição de sequelas fibróticas (Travassos e Taborda, 2012). Lectinas com atividades imunomoduladoras, capazes de desenvolver um padrão de resposta Th1, sabidamente protetora ao hospedeiro contra PCM, são bons alvos para investigação.

1.4. O envolvimento dos receptores do tipo Toll nas infecções fúngicas

A imunidade inata é considerada sentinela do sistema imunológico. Ela confere rápido reconhecimento de microrganismos invasores através de vários tipos de receptores que são conservados, transmembrânicos ou intracitoplasmáticos, chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Eles reconhecem um grupo de padrões moleculares conservados e comuns a grandes grupos de espécies microbianas, denominados PAMPs (Janeway e Medzhitov, 2002; Roeder et al, 2004). Os PAMPs, por sua vez, correspondem a moléculas importantes para a sobrevivência dos patógenos (revisto por Kumar, et al., 2009), não são expressos em células do hospedeiro, fazendo com que os PRRs sejam capazes de discriminar o próprio do não próprio (Kawai e Akira, 2009).

A primeira etapa para a ativação de macrófagos é o reconhecimento de componentes fúngicos através dos PRRs, que sinalizam para o hospedeiro a presença da infecção. Dentre eles, a mais conhecida classe de PRRs são os TLRs, expressos em células fagocíticas e células dendríticas (DCs). Os TLRs, ao reconhecerem PAMPs, desencadeiam a liberação de citocinas inflamatórias e interferons do tipo I, importantes para a defesa do hospedeiro, especialmente contra patógenos de parasitismo intracelular (Beutler, 2009).

Os TLRs estão distribuídos de acordo com características estruturais e especificidade por ligantes. Sendo assim, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 encontram-se na superfície celular sendo ativados por moléculas que estão presentes ou são secretadas por microrganismos no momento da adesão ou invasão. Já os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos na membrana de vesículas intracelulares, como endossomos, lisossomos e retículo endoplasmático e reconhecem ácidos nucleicos (Blasius e Beutler, 2010). Estruturalmente, esses receptores são glicoproteínas integrais de membrana do tipo I, que têm uma estrutura trimodular. O domínio N-terminal é extracelular, sendo formado por aproximadamente 16 a 28 regiões repetidas ricas em leucina (LRRs). Cada LRR consiste de 20 a 30 aminoácidos

com *motif* conservado em "LxxLxLxxN". Essas regiões repetidas, ricas em leucina, são encontradas em proteínas citoplasmáticas e transmembrânicas, e estão envolvidas no reconhecimento do ligante e na transdução de sinal (Kobe e Deisenhofer, 1995). O exato local onde essas regiões medeiam o reconhecimento do ligante ainda é desconhecido. Os *motifs* "LxxLxLxxN" são localizados na superfície interna da região côncava da estrutura em forma de ferradura, formada por folhas beta paralelas. As partes variáveis do *motif* estão na superfície convexa (Jin e Lee, 2008). O domínio C-terminal é intracelular e conhecido como o domínio receptor Toll/IL-1 (TIR), por ter homologia com o domínio do receptor de IL-1. Esse domínio é necessário para a interação e o recrutamento de várias moléculas adaptadoras, implicadas na ativação da via de sinalização *downstream* (Kumar, et al., 2009). O domínio TIR é conservado e modulado pela interação proteína-proteína. Interessantemente, todas as proteínas que contêm o domínio TIR estão envolvidas na defesa do hospedeiro, fazendo desse domínio um dos primeiros *motifs* envolvidos na sinalização (Aravind et al., 1999).

A primeira evidência de que TLRs são importantes na defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas, foi demonstrada pela extrema susceptibilidade de drosófilas deficientes de *Toll* à aspergilose (Lemaitre et al., 1996). Em 2002, Netea e seus colaboradores foram os primeiros a descreverem o reconhecimento de *Candida albicans*, via TLR. Eles observaram que a ausência de sinais mediados por TLR4 resultou no aumento da susceptibilidade à candidíase disseminada em camundongos nocautes para TLR4, por prejudicar o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Estudos recentes também tem demonstrado o envolvimento desses receptores no reconhecimento de *Aspergillus fumigatus* e *C. neoformans* (Bellocchio et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Netea et al., 2002; Yauch et al., 2004).

A interação entre as moléculas da superfície do fungo com TLRs presentes em células fagocíticas, modula a fagocitose e a ativação dessas células. Macrófagos e células dendríticas ao fagocitarem patógenos invasores, ingerem e matam esses patógenos e, em seguida, acionam o sistema imunológico adaptativo pela secreção de citocinas e quimiocinas. Essa habilidade de TLRs em promover a produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas e macrófagos, faz com que eles desempenhem um papel importante no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Brown, J. et al., 2010). Sendo assim, o reconhecimento de partículas fúngicas via TLR de células fagocíticas, resulta na expressão de genes da resposta inata, com propriedades reguladoras da resposta adaptativa (McInturf et al., 2005).

Em contraste com os componentes da imunidade inata, principalmente localizados nos tecidos periféricos, os da imunidade adaptativa estão localizados principalmente em tecidos

linfóides secundários. Células dendríticas imaturas, ao reconhecerem PAMPs em tecidos periféricos, através de PRRs, amadurecem e migram para os tecidos linfóides secundários, onde apresentam os antígenos e ativam linfócitos. Portanto, a estimulação da imunidade adaptativa é dependente de células dendríticas ou de outras células apresentadoras de antígenos (APCs). Esse quadro ilustra a importância dos TLRs no desencadeamento dos eventos que levarão ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (Beutler, 2009).

Após a ativação do sistema imune inato via TLRs, fortes sinais pró-inflamatórios são gerados, induzindo uma reação inflamatória e a ativação da defesa do hospedeiro. Com a eliminação do patógeno invasor, subsequentes sinais anti-inflamatórios são responsáveis pela resolução da inflamação (De Waal Malefyt, et al., 1991). Estes sinais são cruciais, não apenas para o retorno do sistema imunológico ao seu estado de equilíbrio homeostático, mas também para a proteção do hospedeiro contra os efeitos deletérios de uma excessiva inflamação e também para o reparo do tecido subsequente (Cohen et al., 2002). A sinalização dos TLRs está envolvida em ambas as vias. Primariamente induzindo uma reação inflamatória, e de maneira secundária, ativando mecanismos anti-inflamatórios (Figura 2). Em consonância com estas descrições, trabalhos demonstraram que a ausência de TLR2 ou TLR4 resulta no aumento da mortalidade de animais expostos a inflamação excessiva nos modelos experimentais de meningite pneumocócica (Koedel et al., 2003) ou na infecção por *Bordetella pertussis* (Higgins et al., 2003).

Figura 2. Sinalização via receptores do tipo Toll (TLR) na indução de uma resposta inflamatória e na ativação de mecanismos anti-inflamatórios (Netea et al., 2006).

Estudos recentes sobre a biologia dos PRRs demonstraram que, enquanto o reconhecimento inato é fundamental para uma eficiente resposta imune, alguns fungos patogênicos utilizam-se da estratégia dos PRRs para evadir das defesas do hospedeiro (Hirschfeld et al., 2001). Embora os TLRs promovam uma resposta imunológica contra agentes patogênicos, modelos experimentais sugerem que a levedura penetre no macrófago do hospedeiro através dos receptores TLR2, TLR4 e dectina-1, evadindo da resposta imunológica do hospedeiro. Embora esses receptores estejam envolvidos no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis*, contribuindo para a sua sobrevivência, por outro lado eles também ativam a resposta imunológica contra esse fungo (Calich et al., 2008; Bonfim et al., 2009). Dessa forma, os macrófagos constituem-se em nicho de replicação do fungo, ao mesmo tempo em que eles são a principal linha de defesa celular contra *P. brasiliensis*, sendo que o resultado dessa interação é determinante no curso da PCM (Moscardi-Bacchi et al., 1994).

Objetivos

2. Objetivo geral

Investigar a ação imunomoduladora da paracoccina e seu efeito sobre o curso da paracoccidioidomicose (PCM) experimental. Elucidar o mecanismo responsável pela imunomodulação induzida por paracoccina.

2.1. Objetivos específicos

1. Expressar o gene PADG_03347 em sistema bacteriano; obter paracoccina recombinante (rPCN).
2. Avaliar se rPCN reproduz as atividades lectínica e enzimática da paracoccina nativa.
3. Investigar o efeito da administração profilática e terapêutica de rPCN sobre o curso da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos, de acordo com os seguintes parâmetros:
 - carga fúngica pulmonar;
 - histopatologia pulmonar;
 - níveis de citocinas no tecido pulmonar.
4. Investigar a ocorrência de ativação de receptores do tipo Toll por rPCN, em células HEK293T apropriadamente transfectadas com TLR2 ou TLR4, buscando avaliar:
 - 4.1. Influência da heterodimerização de TLR2;
 - 4.2. Papel exercido pelas moléculas acessórias, CD14 e CD36.
5. Identificar quais as glicanas N-ligadas a TLR2 estão implicadas no efeito ativador de rPCN.

Material e Métodos

3.1 Expressão e purificação do gene PADG_03347

3.1.1 Análise da expressão protéica em *E. coli*

O gene códon otimizado (GenScript) no vetor PUC57 (figura 3), foi introduzido em *E. coli* BL21(DE3) após 10 min de incubação no gelo seguidos por 10 min à temperatura ambiente (TA). Após a transformação, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de meio LB suplementado com 20 mM de glicose e 10 mM de cloreto de magnésio.

As células foram incubadas sob agitação a 37°C por 1 h, e plaqueadas em LB suplementado com ampicilina. Posteriormente a placa foi mantida em cultura a 37°C O/N. Os clones resistentes à ampicilina foram selecionados e submetidos à reação de amplificação do gene.

Uma colônia positiva a reação de amplificação foi inoculada em 5,0 mL de meio LB - ampicilina. A cultura foi incubada até o dia seguinte (16 h) a 37°C, com agitação de 180 rpm (pré-inóculo). Em seguida, os 5 mL do pré-inóculo foram diluídos em 500 mL (1:100) de meio LB - ampicilina e incubada a 37°C sob agitação (180 rpm) até atingir a $DO_{600nm} = 0,6$. Nesse instante, adicionou-se ao cultivo IPTG na concentração final de 0,5 mM. Posterior a indução com IPTG por 4 h, a cultura foi centrifugada a $3.000 \times g$ por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se tampão de lise (EDTA a 5 mM, NaCl a 100 mM, PMSF a 1 mM e Tris-HCl a 50 mM pH 7,4) ao sedimento de bactérias. Em seguida, o pellet foi submetido à sonicação, constituindo-se de 6 pulsos de 25 s, com intervalos de 60 s. Adicionou-se Triton X-100 na concentração final de 1 %, sob agitação, e centrifugou-se a $3.000 \times g$ por 30 min. As proteínas da fração solúvel e insolúvel foram estocadas a -20°C para análise da expressão de proteínas recombinantes em SDS-PAGE.

Figura 3. Estratégia para síntese do gene PADG_03347.

3.1.2 Purificação da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão

A proteína encontrada na fração insolúvel (corpo de inclusão) foi submetida ao processo de *refolding*, segundo metodologia descrita por GU *et al.*, 2002, com modificações. As proteínas insolúveis foram ressuspensas em tampão de solubilização (50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 0,5 % de Triton X-100 (v/v) e 0,1 mM de PMSF pH 7,6). As amostras, após sonicadas por 30 s, 5 vezes, com intervalos de 1 min, foram centrifugadas a 11.000 x g por 15 min a 4°C. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes. Em seguida a amostra foi lavada com Tris-HCl a 20 mM e NaCl a 200 mM e sonicada, por 3 vezes de 20 s, com intervalos de 1 min. Seguiu-se centrifugação a 11.000 x g por 15 min a 4°C. Ao final das lavagens, os corpos de inclusão foram ressuspensos em tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio, 0,5 M de NaCl, e 8 M de uréia), sonicados por 3 vezes de 20 s e incubados durante uma noite sob agitação orbital à TA.

Após completa solubilização dos corpos de inclusão, a amostra foi novamente centrifugada para remoção de qualquer material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para a realização do *refolding* como descrito abaixo.

3.1.3 “Refolding” pelo método de diálise

As proteínas recombinantes solubilizadas foram diluídas em tampão de *refolding* (100 mM de Tris-HCl, 50 mM de glicina, 0,5 de EDTA, 0,2 mM PMSF e 8 M de uréia pH 8,0). A amostra foi dialisada contra tampão de *refolding* contendo concentrações decrescentes de uréia (6, 5, 4, 2, 1, 0,5 e 0 M), utilizando membrana de diálise (Sigma-Aldrich St. Louis, MO USA). O tempo de diálise em cada concentração de uréia foi de 20 a 24 h. Após remoção da uréia, a amostra foi ultrafiltrada em sistema Amicon (W.R. Grace and Co., Beverly, USA) contra 100 mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA, utilizando membrana YM10 (Millipore Co., Billerica, MA, USA).

3.1.4 Purificação da proteína recombinante em coluna de N-acetilglicosamina

Cumprida a etapa de *refolding*, a proteína recombinante foi submetida à cromatografia de afinidade, sendo incubada O/N a 4°C sob agitação orbital em N-acetilglicosamina (GlcNAc) imobilizada em agarose. Após período de incubação, a coluna foi lavada com PBS até que o líquido de passagem pela coluna tivesse DO_{280nm} inferior a 0,002. O material retardado na coluna foi eluído com glicose 2 M, e dialisado contra PBS em sistema Amicon (W.R. Grace and Co., Beverly, USA), utilizando discos de diálise YM-10 (Millipore Co., Billerica, MA, USA).

3.1.5 Remoção de endotoxinas em coluna de Polimixina-B da preparação de proteína recombinante

As endotoxinas são consideradas resistentes à temperatura e ao pH, o que dificulta sua eliminação no processo de purificação de proteínas (Sharma, 1986). Um dos métodos usados para eliminar endotoxinas é a adsorção à polimixina-B (Anspach e Hilbeck, 1995). Assim, a purificação em coluna de N-acetilglicosamina, foi seguida de adsorção em resina conjugada à polimixina-B imobilizada (Bio-Rad). Para isso, a coluna foi previamente lavada com deoxicolato a 1 %, seguido por 3 lavagens com PBS livre de LPS. A amostra foi adicionada a coluna e permaneceu incubada por 2 h à TA. Posteriormente o material não ligante foi recuperado e seguiu-se nova etapa de lavagem da coluna com a solução de deoxicolato.

3.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida (12 %) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), em sistema “Mini Vertical Gel Electrophoresis System” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5 M pH 6,5, SDS a 2 % (m/v) e glicerol a 10 % (v/v)], reduzidas com mercaptoetanol a 3,5 % e fervidas por 10 min. As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 60 min (80-120 mA, 200 V). O gel foi corado com azul de Coomassie (Pierce). Os marcadores utilizados foram os contidos em mistura pré-corada (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), constituído de 6 proteínas cujas massas moleculares variaram de 20 a 120 kDa.

3.1.7 Produção e purificação de anticorpos aviários

3.1.7.1 O processo de imunização

O procedimento de imunização de galinhas foi realizado de acordo com Akita e Nakai (1992), com modificações. Para obtenção do anticorpo policlonal anti-rPCN, uma galinha foi imunizada no dia zero, com 80 µg do material purificado em 1,0 mL de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). As emulsões foram injetadas pela via intramuscular (músculo peitoral das aves). Doses de reforço foram administradas após a 2^a, 4^a, 6^a semanas, utilizando-se adjuvante incompleto de Freund. Os ovos foram coletados diariamente e estocados a 4°C. Ovos foram recolhidos no período pré-imunização para obtenção de anticorpos IgY utilizados como controle (IgY irrelevante).

3.1.7.2 Separação e purificação de IgY da gema de ovos

A fração solúvel da gema do ovo foi preparada de acordo com Akita e Nakai (1993). Os ovos foram lavados em água, quebrados e colocados sob papel de filtro Whatman nº1 para separar as gemas das claras. Em seguida, as gemas foram passadas em funil para separar o conteúdo da gema e a membrana corioalantóide. O conteúdo da gema foi diluído em 9 partes de água MilliQ (1:10). Após 6 h em leve agitação a 4°C, os lipídeos de alta densidade foram precipitados por centrifugação (10.000 × g, 25 min, 4°C) e o sobrenadante, rico em IgY, foi coletado.

Para a purificação de IgY foi utilizado o método de precipitação com sulfato de amônio a 40 % (Ko e Ahn, 2007; Li et al., 2007). A fração solúvel da gema do ovo foi

colocada sob agitação constante a 4°C para a adição, gota a gota, da solução de sulfato de amônio. Em seguida, centrifugou-se a solução a 10.000 x g por 10 min, e o primeiro sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi ressuspenso em PBS para o volume inicial da fração solúvel. Foram feitas mais duas precipitações e o último precipitado, após ser ressuspendido em PBS azida, foi ultradiafiltrado em sistema Amicon contra PBS, utilizando membrana YM-10 (Amicon Div. W. R. Grace CO. Danvers, MA, USA), para remoção do sulfato de amônio.

3.1.8 Western blotting

A reatividade da proteína recombinante com anticorpo de galinha (IgY) anti-PCN (nativa) foi ensaiada por Western blot. Após separação eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), houve transferência para membrana de nitrocelulose, em sistema de Mini trans-blotTM (Bio-Rad), realizada a 300 V e 60 mA, por 2 h. A membrana de transferência foi corada com Ponceau S (0,5 g de Ponceau, 2,5 mL de ácido acético para 250 mL de água), para visualização das bandas transferidas e avaliação da eficiência da transferência. Depois de lavada com PBS, a membrana foi incubada por 1 h a TA com solução de bloqueio contendo 3 % de leite desnatado em PBS, adicionado de Tween-20 a 0,05 %. Posteriormente, a membrana foi incubada em leite desnatado 1 % contendo IgY anti-PCN, na diluição de 1:400, e incubada à TA por 1 h. A membrana foi lavada com PBS-Tween 0,05 %, por cinco vezes e, a seguir, foi incubada, por mais uma hora a TA em leite desnatado 1 % contendo o anticorpo de coelho anti-IgY (1:6.000), conjugado à peroxidase. A revelação foi feita pelo uso de substrato quimioluminescente (Sigma-Aldrich), e exposição a filmes radiográficos (Kodak).

3.1.9 Biotinilação da proteína recombinante

A biotinilação da proteína recombinante (2 mg) foi procedida pela incubação com 20 µL da solução de sulfo-NHS-LC a 1 % em água destilada, por 2 h, à 4°C, ao abrigo da luz. A proteína recombinante biotinilada foi dialisada em sistema centricon YM-30 (Millipore Centricon®) contra PBS, para eliminação da biotina livre, não conjugada à proteína. Ao final da diálise, o material foi ressuspenso no volume de 300 µL e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.1.10 Ensaio de ligação a laminina e inibição por açúcar

Para o ensaio de ligação à laminina, poços de uma microplada foram recobertos com 250 ng de laminina purificada de sarcoma EHS de camundongo diluída em tampão carbonato de sódio 0,2 M pH 9,6 e incubado por 16 h a 4°C. Então, a placa foi lavada por 4 vezes com PBS-Tween 0,05 % e bloqueada com gelatina 3 % em PBS-Tween 0,05 %, a 37°C por 2 h,. Diferentes quantidades (25, 50, 100 e 200 ng) da proteína biotinizada foram adicionadas aos poços; a reação ocorreu à TA por 1 h e 30 min. Após 4 lavagens, adicionou-se aos poços neutravidina conjugada a peroxidase diluída em gelatina 1 % PBS-Tween 0,05 % e a placa foi incubada à TA por mais 1 h e 30 min. Após lavagem dos poços, a reação foi revelada através da adição do substrato da enzima, O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), e interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. As leituras foram feitas em $\lambda = 490$ nm em leitor de microplacas (Power Wave – Bio Tek Instruments, INC).

Para o ensaio de inibição por açúcar, a proteína recombinante biotinizada, antes de ser adicionada aos poços da microplada, foi incubada a TA por 1 h com um dos seguintes monossacarídeos: N-acetilglicosamina, D-glicose e D-galactose, todos na concentração de 100 nM. Desvio padrão calculado com base nos ensaios em triplicatas (unidades de luminescência relativa, RLU).

3.1.11 Atividade imunobiológica da proteína recombinante

3.1.11.1 Obtenção de macrófagos peritoniais murinos

Camundongos C57BL/6 foram injetados intraperitonealmente com 1,0 mL de tioglicolato de sódio estéril 3 % (SIGMA Chemical CO.). Foram sacrificados 4 dias após a injeção, e células foram coletadas através da lavagem da cavidade peritoneal com 5,0 mL de PBS estéril. A suspensão foi centrifugada a $450 \times g$ a 4°C por 10 min. As células foram ressuspensas em 5,0 mL de meio RPMI contendo 5 % de soro fetal bovino (Gibco BRL USA). Em câmara de Neubauer, o número de células viáveis foi contado, utilizando-se a diluição de 1/100 em solução de azul de tripan. A suspensão foi ajustada para conter 10^6 células por mL, e adicionou-se volume de 1,0 mL dessa suspensão a cada poço da placa de 24

poços. Seguiu-se incubação em estufa contendo 5 % de CO₂ por 1 h, permitindo a adesão dos macrófagos.

3.1.11.2 Estimulação das células aderentes

Para avaliar a capacidade de ativar macrófagos, as células aderentes foram incubadas com 0,25 µg/mL da proteína recombinante, tendo LPS (1 µg/mL) mais interferon-γ (1,5 ng/mL) como controle positivo e apenas meio de cultivo como controle negativo. Seguiu-se nova incubação a 37°C por 48 h em estufa contendo 5 % de CO₂. O sobrenadante da cultura foi coletado, e estocado a 4°C, para determinação dos níveis de TNF-α e óxido nítrico produzidos.

3.1.11.3 Dosagem de TNF-α

A dosagem de TNF-α foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o Kit BD opTEIA™ SET: Mouse (Pharmigen). O anticorpo anti-TNF-α (anticorpo de captura), diluído em tampão de coating (tampão carbonato de sódio pH 9,0) foi adicionado à placa e incubado O/N a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada por 5 vezes com PBS-Tween 0,5 %, e vertida sobre papel absorvente para remover o tampão residual. Posteriormente a placa foi bloqueada pela adição de PBS-FBS 5 % por 1 h a TA, seguida por 5 lavagens. As amostras foram adicionadas e deixadas à TA por 2 h. Seguiram-se 5 lavagens. O anticorpo de detecção, diluído em PBS-FBS 5 %, foi adicionado à placa e incubado à TA por 1 h. Após nova etapa de lavagem, a enzima diluída em PBS-FBS 5 % foi adicionada aos poços, e incubada à TA por 30 min. Após lavagem, a reação foi revelada através da adição do substrato da enzima, tetrametilbenzamidina (TMB), e interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. As leituras foram feitas em $\lambda = 450$ nm.

3.1.11.4 Dosagem de óxido nítrico

A concentração de NO₂ no sobrenadante de macrófagos foi determinada pelo método de Griess (Grenn *et al.*, 1982), utilizando-se 50 µL do sobrenadante de cada poço da cultura de macrófagos. Uma curva padrão foi construída utilizando-se padrões com concentrações conhecidas de nitrito. A cada poço foram adicionados 50 µL da solução reveladora, contendo ácido fosfórico 5 %, sulfanilamida e NEED 0,1 % (N-1-Naphthyl-ethyl-enediamine

dihydrochloride) em partes iguais (SIGMA Chemical CO – St Louis MO – USA). A placa foi incubada a TA por 10 min e a leitura foi feita em leitor de microplacas, $\lambda = 540 \text{ nm}$. Os resultados foram expressos em μM de NO_2 e comparados com a curva padrão realizada com nitrito de sódio, em concentrações de 200 a $0,78 \mu\text{M}$.

3.1.12 Dosagem da atividade enzimática de N-acetil- β -D-glicosaminidase

Para verificarmos se a proteína recombinante após o processo de *refolding* estaria ativa, também avaliamos sua atividade enzimática utilizando $100 \mu\text{L}$ do substrato p -Nitrofenil-*N*-acetilglicosamina (p -NP-GlcNac), $50 \mu\text{L}$ da amostra contendo $10 \mu\text{g}$ da proteína recombinante e $350 \mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. A reação foi incubada em banho maria a 37°C por 24 h, e posteriormente foi interrompida pela adição de 1 mL de carbonato de sódio $0,5 \text{ M}$. As condições de reação foram as mesmas utilizadas por Yabuki *et al.*, (1986) e adaptadas por Ulhoa e Peberdy (1992). A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro em $\lambda = 405 \text{ nm}$. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar $1,0 \mu\text{Mol}$ de substrato por minuto a 37°C . A atividade específica foi determinada como o número de unidades enzimáticas por mg de proteína total.

3.1.13 Detecção da PCN nas leveduras de *P. brasiliensis*

As leveduras de *P. brasiliensis* do isolado 18 (*Pb18*) foram cultivadas em meio BHI líquido durante 3 dias a 37°C sob leve agitação. As células (10^6 células viáveis/mL) foram fixadas com 3,7 % de paraformaldeído durante 15 min, seguidas por centrifugação a $3.000 \times g$ durante 15 min, e novamente suspensas em 3,7 % de paraformaldeído. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão PBS contendo Tween-20 a 0,05 % e 1 % de BSA (PBS-T), contendo os anticorpos policlonais contra a rPCN durante 1 h à TA. As células foram então lavadas por três vezes com PBS, e incubadas durante 1 h à TA com neutravidina conjugada a AlexaFluor_488 (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) em PBS-T durante 1 h, à TA, ao abrigo da luz. Depois de 40 min, $10 \mu\text{g/mL}$ de calcoflúor (Sigma-Aldrich) foram adicionados durante os últimos 20 min da incubação. Após lavagem com PBS, as lamínulas foram colocadas sobre as lâminas de vidro com Permout (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e a fluorescência foi analisada utilizando microscópio de fluorescência. Os cortes foram analisados por meio de um microscópio confocal de varredura

a laser (LSM -510 NLO; Carl Zeiss, Jena, Alemanha), utilizando $40 \times \text{NA } 1,3$ e $63 \times 1.4 \text{ NA}$, sob o plano de objetivas apocromáticas. Para os estudos de microscopia de contraste de fase, as amostras foram observadas em um microscópio de imunofluorescência (DMI 4000B; Leica, Culver City, CA, EUA). As imagens foram processados com auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

3.1.14 Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c, entre 4 e 6 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de camundongos isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo 20/2013-1).

3.1.15 Cultivo de leveduras de *P. brasiliensis*

Para a infecção dos animais foram utilizadas leveduras do isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18), obtidas a partir do cultivo do fungo em meio BHI (Brain Heart Infusion-HiMedia, Mumbai, Índia), de 3 a 7 dias, a 37°C sob leve agitação. A virulência dos isolados foi mantida através de inoculação periódica das leveduras em camundongos, com posterior recuperação em meio de cultura BHI-ágar. A escolha do isolado 18 foi baseada na sua alta virulência em animais, já bem conhecida na literatura.

3.1.16 Administração da proteína recombinante (rPCN) ou do veículo

Para avaliar o efeito profilático e terapêutico da rPCN sobre a infecção experimental por *P. brasiliensis*, foram formados grupos de 5 camundongos por protocolo experimental (esquema 1). Todas as injeções foram feitas com $0,5 \mu\text{g}$ da rPCN em $100 \mu\text{L}$ de PBS que foram injetados subcutaneamente (s.c.) no flanco direito. No protocolo A, os animais foram tratados com a rPCN previamente a infecção com *P. brasiliensis*, enquanto no protocolo B, os animais receberam a rPCN após à infecção com o fungo. Os animais de cada um dos protocolos experimentais foram subdivididos em 4 grupos de acordo com o regime de administração da rPCN, que variou no número de injeções (entre 1 e 3 doses), e nos intervalos de tempos pré-estabelecidos (tabela 1).

Protocolo A – administração profilática **Protocolo B – administração terapêutica** **Tabela 1.** Grupos experimentais.

Protocolo A Profilaxia	Regime de tratamento (dias antes da infecção)	Protocolo B Terapêutico	Regime de tratamento (dias após a infecção)
PBS	17°, 10° e 3°	PBS	3°, 10° e 17°
G1	17°, 10° e 3°	G1	3°, 10° e 17°
G2	10° e 3°	G2	3° e 10°
G3	10°	G3	10°
G4	3°	G4	3°

3.1.17 Infecção dos camundongos com leveduras de *P. brasiliensis*

Os camundongos foram infectados por via intravenosa (i.v.), com 10^6 células viáveis de *P. brasiliensis*, ressuspensas em 100 μ L de PBS estéril. As leveduras foram cultivadas entre 3 e 7 dias, precipitadas por centrifugação a $1.000 \times g$, 4°C por 10 min e ressuspensas em PBS estéril para completa remoção do meio de cultura. A separação dos grumos foi garantida por agitação mecânica usando pérolas de vidro (4 mm de diâmetro) e vórtex por 20 s. Em seguida a concentração das leveduras foi ajustada para 10^6 em PBS estéril.

3.1.18 Determinação da viabilidade dos fungos para infecção

A viabilidade foi determinada usando a técnica de diacetato de fluoresceína-brometo de etídio (Calich *et al.*, 1979). Para tanto, foram utilizados 100 μ L de uma suspensão de leveduras em PBS estéril, juntamente com uma solução contendo 100 μ L de brometo de etídio (50 mg/mL - Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) e 100 μ L de diacetato de fluoresceína (2 μ g/mL - Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA), preparadas no momento do uso. A mistura foi incubada por 10 min a 37°C, na ausência de luz. Após o período de incubação, a viabilidade das células fúngicas foi determinada usando microscópio de fluorescência, sendo que aquelas que apresentaram coloração esverdeada foram consideradas como vivas e viáveis, e as que apresentaram coloração avermelhada foram consideradas mortas. Apenas as suspensões de leveduras com viabilidade superior a 90 % foram utilizadas para a infecção. Ainda para a contagem das células viáveis, foi utilizado o corante azul de tripan, que auxiliou em um segundo passo na exclusão das células mortas.

3.1.19 Recuperação de leveduras a partir do pulmão dos animais infectados

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical 30 dias após a infecção, e a carga fúngica no pulmão foi examinada, como descrito anteriormente (Singer-Vermes *et al.*, 1992). Os órgãos foram assepticamente removidos, pesados e divulsionados em 1 mL de PBS estéril usando homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax T25 Basic, IKA Works, Inc., Wilmington, USA). Os homogeneizados dos órgãos foram seriadamente diluídos e plaqueados, em duplicata, em meio BHI-ágar (HiMedia, Mumbai, Índia) suplementado com 4 % (v/v) de soro bovino inativado (FCS; Invitrogen, Camarillo, CA, USA), acrescido de 96 μ g/mL de gentamicina (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.), para determinação do número de células viáveis. As placas foram vedadas com auxílio de filme plástico, a fim de se evitar o ressecamento do meio de cultura, e incubadas a 35°C entre 7 e 14 dias, para posterior

contagem das colônias. Os resultados foram expressos como o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de tecido. Além disso, os macerados foram centrifugados a $2.000 \times g$ por 15 min, e os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20°C até a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção das citocinas e para a reação de Griess para detecção de óxido nítrico (NO).

3.1.20 Dosagem de IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF- α e IFN- γ a partir do sobrenadante do pulmão

As dosagens de citocinas foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o sistema OptEIATM SET: Mouse (Pharmingen, San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos monoclonais específicos para cada citocina a ser dosada (anticorpo de captura), foram diluídos em tampão de coating (tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6) e adicionados a placa, sendo incubados O/N a 4°C . As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween-20 (PBS-T) e incubadas com uma solução de PBS contendo 10 % de soro fetal bovino inativado (tampão de bloqueio) durante 1 h a TA. Após bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T, e foram adicionados os sobrenadantes dos órgãos homogeneizados ou diferentes concentrações das citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12 (p40/p70) recombinantes, nas concentrações indicadas pelo fabricante, seguindo 2 h à TA de incubação. Seguiram-se 5 lavagens. O anticorpo de detecção conjugado a biotina específico a cada citocina, foi adicionado a placa e deixado a TA por mais 1 h. Após 1 h de incubação, as placas foram lavadas e a reatividade revelada pela adição de tetrametilbenzidina (TMB), na concentração sugerida pelo fabricante (Pierce). A reação foi bloqueada após 20 min com ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada a $\lambda = 450 \text{ nm}$ em leitor de microplacas (Power Wavex – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC). As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas utilizando-se a curva de regressão linear, a partir de curva padrão realizada para as respectivas citocinas.

Para a dosagem de TNF- α foi adotado um protocolo semelhante ao utilizado para a dosagem das demais citocinas, com exceção da etapa referente ao anticorpo de detecção. Nessa etapa, o anticorpo anti-TNF- α biotinilado foi adicionado à placa e incubado durante 1 h à TA. Após lavagens, adicionou-se avidina conjugada a peroxidase por mais 30 min, protegido da luz. Seguiu-se então novo ciclo de lavagem e a reatividade foi determinada como descrito para as demais citocinas.

3.1.21 Histologia a partir do tecido pulmonar

Parte do pulmão dos camundongos dos diferentes grupos experimentais foi fixada em formaldeído a 10 % tamponada com fosfato a 0,1 M, desidratada, embebida em parafina, seccionada em cortes de 5 μ m e corada com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histológica por microscopia ótica ou por metanamina nitrato de prata de Grocott (GMS-Grocott's Methenamine Silver) para a visualização dos fungos nos granulomas (Grocott, 1955).

3.1.22 Morfometria dos granulomas

Os cortes histológicos dos pulmões, corados de acordo com o protocolo descrito por Zdero et al., 1993, foram utilizados para análise da área e do número de granulomas/mm² de tecido. Estes foram observados em microscópio Carl Zeiss axiophot acoplado a uma câmera JVC TK1270 e ao computador, o qual tem o programa KS-400 v2.0. A objetiva utilizada para este experimento foi de 10 X, para todos os tecidos analisados.

3.1.23 Plasmídeos utilizados na transfecção

Os constructos contendo CD14, MD-2 e receptores do tipo Toll, bem como o constructo de β -actina Renilla luciferase e o gene repórter *firefly* ELAM-1, foram gentilmente cedidas por Richard Darveau (University of Washington, Seattle, WA). O CD 36 foi cedido pelo Dr. Kathryn J. Moore (Harvard Medical School, Boston, MA). Todos os plasmídeos utilizados nas transfecções foram purificados utilizando o Kit de Maxiprep EndoFree (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

As condições das construções de cada um dos plasmídeos utilizados na transfecção estão listadas na tabela abaixo.

Tabela 2. Plasmídeos do complexo TLR2.

Mouse CD14	Clonado no vetor de expressão pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen). (Underhill et al., 1999).
Mouse MD-2	Clonado no vetor pEFBOS (Akashi et al., 2000; Mizushima e Nagata, 1990).
Mouse TLR1, TL4 e TLR6	Clonado no vetor pDisplay (Invitrogen) modificado que contem peptídeo sinal em um tag HA amino-terminal. No vetor modificado, o <i>tag</i> de <i>myc</i> e o domínio transmembrânico PDGFR foram deletados (Hajjar et al., 2001).
Mouse TLR2	Clonado no vetor pDisplay (Invitrogen) modificado e obteve o cassete de resistência a neomicina substituído pelo cassete de zeomicina (Underhill et al., 1999)
ELAM-1-firefly luciferase	O promotor de E-selectina contendo um sítio ligante de NFκB foi clonado acima do gene repórter <i>firefly luciferase</i> no plasmídeo básico pGL2-basic (Promega) (Schindler & Baichwal, 1994).
β -actina renilla luciferase	O promotor de β-actina foi clonado acima do gene <i>Renilla luciferase</i> no plasmídeo nulo pRL (Promega) (Sweetser et al., 1998).
Mouse CD36	Clonado dentro de pcDNA3.1/hygro (Invitrogen) (Stuart et al., 2005).

3.1.24 Preparação dos plasmídeos utilizados nos ensaios de transfecção

Os plasmídeos utilizados no neste trabalho foram cedidos pelo Prof. Dr. Igor C. Almeida (UTEP, El Paso, Texas, EUA) e pelo Prof. Dr. Nicholas J. Gay (Universidade de Cambridge, Reino Unido). Os plasmídeos obtidos foram eletroporados em *E. coli* DH5α, amplificados e isolados para serem transfectados nos ensaios com células HEK293T.

3.1.25 Preparação das células

Bactérias *E. coli* DH5α foram estriadas em uma placa com LB-ágar e deixadas O/N a 37°C. No outro dia, 1 colônia foi pré-inoculada em 3 mL de meio LB e deixadas sob agitação a 200 rpm O/N a 37°C. No dia seguinte, 100 µL do pré-inóculo foi transferido para um novo inóculo contendo 100 mL de meio LB. A cultura foi novamente incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO_{600nm} entre 0,5 e 0,6. A cultura foi mantida em repouso no gelo por 15 min, sendo posteriormente centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 4°C. O pellet de bactérias foi lavado por 5 vezes com água destilada gelada, seguida por duas lavagens com glicerol 10 % gelado. Alíquotas de 40 µL foram distribuídas e imediatamente congeladas com auxílio de nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.1.26 Eletroporação

Para eletroporação foi utilizado 1 µL do plasmídeo de interesse em 40 µL das células eletrocompetentes. Após homogeneização, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 mm. A eletroporação foi realizada em eletroporador BioRad Gene Pulse nas condições de 1,25 volts, 100 Ω de resistência e 25 µFD de capacitância. Após a eletroporação as células foram transferidas para um tubo novo, e foi acrescentado 1 mL de meio LB acrescido de glicose a 1 M. As células foram recuperadas por 1 h a 37°C sob agitação. Logo após, diferentes volumes foram plaqueados em meio LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina e mantidas O/N a 37°C. As colônias crescidas na placa foram selecionadas e repicadas em 3 mL de meio LB acrescido de ampicilina na concentração de 100 µg/mL e mantidas O/N a 37°C. Uma parte do material foi estocada em glicerol 20 % sendo imediatamente congelada a -80°C. A outra parte foi utilizada para extração dos plasmídeos utilizando kit de miniprep, de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA). A quantificação do material foi realizada em espectrofotômetro e o material armazenado a -20°C até o momento do uso. Após certificação dos plasmídeos em gel de agarose, e a confirmação da sequência dos mesmos, as bactérias foram preparadas para a realização de MaxiPrep através do kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen), e os plasmídeos gerados foram utilizados nos ensaios de transfecção em células HEK293T.

3.1.27 Ligantes de TLRs

Os agonistas utilizados nos ensaios de transfecção foram: Pam3Cys-SKKKK (P3C), agonista triacilado sintético e FSL-1, agonista diacilado, ambos da empresa EMC Microcollections. Também foi utilizado com agonista o lipopolissacarídeo ultra puro (LPS) de *E. coli* da cepa O111:B4 (Invivogen).

3.1.28 Transfecção transiente em HEK293T com os complexos de TLRs

Células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco modificado por Eagle) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (FBS) (HyClone, Logan, UT). As células foram semeadas em placas de 12 poços (5×10^5 células/poço). No dia seguinte, as células foram transfectadas com CD14, CD36, MD-2 e/ou *mouse* TLR1, TLR2, TLR4, TLR6. TLR2 foi transfectado sozinho ou em combinação com os plasmídeos TLR1 (TLR1/2) ou TLR6 (TLR2/6) juntamente com o repórter ELAM-1-*firefly luciferase* e com β-actina-Renilla utilizando Lipofectamine 2000

(Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA total por poço foi normalizada para 2 µg pela adição do vector vazio. No dia seguinte, as células transfectadas foram transferidas para placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/poço). Após 24 h, as células foram estimuladas por 20 h para a detecção de IL-8 no sobrenadante da cultura. Como estímulo foram utilizados os agonistas nas concentrações indicadas e diferentes concentrações de rPCN, que foram previamente incubadas por 1 h a TA com polimixina.

3.1.29 Construção dos plasmídeos mutantes nos sítios glicosilados de TLR2

Os plasmídeos foram construídos e gentilmente cedidos pelo Dr. Nicholas Gay da Universidade de Cambridge, descritos por Weber et al., 2004. O plasmídeo de TLR2 sofreu mutação sítio dirigida, e tal protocolo foi realizado de acordo com Stratagene QuickChange Kit. Os primers *forward* e seus complementares *reverse* foram utilizados para na estratégia de mutação. Em negrito os códons mutados encontram-se destacados, e as bases alteradas aparecem em itálico: N114S, atcc tat aat tac tta tct **tct** tta tgc tct tcc tgg ttc aag ccc; S114N, atcc tat aat tac tta tct **aat** tta tgc tct tcc tgg ttc aag ccc; N199D, aagt ttg aag tca att cag **gac** gta agt cat ctg atc cttc; D199N, aagt ttg aag tca att cag **aac** gta agt cat ctg atc cttc; T416A; tg ctc act ctg aaa aac ttg **gct** cta aca ttg ata tca gta ag; A416T, tg ctc act ctg aaa aac ttg **act** cta aca ttg tca gta ag; N442D, ca gaa aag atg aaa tat ttg **gac** tta tcc agc aca cga ata cac; D442N, ca gaa aag atg aaa tat ttg **aac** tta tcc agc aca cga ata cac. Os insertos mutagênicos foram sequenciados e então clonados no vetor original para evitar mutações externas às regiões sequenciadas.

3.1.30 Transfecção dos plasmídeos mutantes dos sítios de glicosilação de TLR2 em células HEK 293T

Células HEK293T (Human Embryonic Kidney) foram mantidas sob cultivo em meio DMEM (Sigma Chemical CO.) contendo 10 % de soro bovino fetal, plaqueadas (3,5 x 10⁴/poço) em placa de 96 poços e transfectadas com 60 ng de TLR2 *wild type* ou com as variantes mutadas, sempre acrescida de 70 ng do vetor vazio, 60 ng de NFκB combinado com gene repórter de luciferase e 5 ng do vetor *Renilla luciferase* utilizada como controle interno da transfecção. A transfecção foi realizada com o uso de Lipofectamine 2000, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen Life Technologies). No dia seguinte, as células foram estimuladas com FSL-1, agonista de TLR2 e com rPCN previamente incubada com polimixina. Após 20 h de estímulo, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de IL-8 por ELISA.

3.1.31 Detecção de IL-8

Após 20 h ao estímulo, o sobrenadante foi coletado para detecção de IL-8 utilizando o kit OpTEIA Human IL-8 ELISA kit (BD Biosciences) tendo como referências os valores obtidos na curva padrão da IL-8 recombinante. Os resultados representam a média e o desvio padrão de valores em triplicata. A confirmação dos resultados se deu pela repetição de todos os experimentos por duas vezes.

3.1.32 Análise estatística dos resultados

A análise estatística das diferenças entre as médias foi avaliada usando a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Diferenças com o $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Os experimentos de infecção representam os dados obtidos de quintuplicata biológica e de triplicata experimental. Enquanto que os experimentos realizados *in vitro*, representam duplicata ou triplicata experimental.

Resultados

Capítulo 1. Expressão, purificação e caracterização parcial da paracoccina recombinante (rPCN)

O processo de obtenção da paracoccina nativa (PCN) é laborioso e proporciona baixo rendimento, limitando a exploração das atividades desempenhadas por esta lectina. Dessa forma, investimos esforços na tentativa de se obter a forma recombinante dessa lectina. Os resultados foram positivos, e após a obtenção da lectina recombinante purificada, algumas atividades já descritas na paracoccina nativa (PCN) foram também avaliadas na paracoccina recombinante (rPCN).

4.1 O produto do gene PADG_03347 foi expresso com sucesso por *E. coli* BL21 (DE)

Para a produção da lectina recombinante, células BL21(DE3) competentes foram transformadas com o plasmídeo pUC57_PADG_03347 e induzidas com IPTG, em duas diferentes concentrações. A figura 4 mostra a análise da expressão da rPCN a partir do lisado de células BL21 (DE3), através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE 10 %). Uma proteína de aproximadamente 28 kDa foi detectada na eletroforese de amostras derivadas da indução com IPTG, em ambas as concentrações utilizadas. A expressão foi acompanhada a intervalos de 1 h, durante um período total de 4 h. Após 1 h da adição do indutor, a banda de 28 kDa, supostamente correspondente a rPCN já podia ser visualizada, em ambas as preparações.

Figura 4. rPCN foi expressa em *E. coli* BL21(DE). Células da linhagem recombinante selecionada foram cultivadas até que proporcionassem $DO_{600\text{ nm}}$ em torno de 0,6 para indução com IPTG. A figura mostra o resultado do tempo de indução/resposta da lectina recombinante detectada no lisado de *E. coli*. Alíquotas foram retiradas da cultura induzida, e as células foram recuperadas por centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensão em tampão de amostra reduzido, e aplicado em SDS-PAGE 10 %. Linha 1: cultura antes da indução com IPTG. Linhas 2, 3, 4 e 5: 1, 2, 3 e 4 h após a adição de IPTG a cultura bacteriana, respectivamente.

4.2 A rPCN após o processo de *refolding* foi solubilizada, e anticorpos anti-PCN reconheceram a lectina recombinante

A dificuldade de obtenção da lectina recombinante na fração solúvel nos levou a purificá-la a partir de corpos de inclusão, estruturas eletro densas constituídas de agregados de proteína, encontradas nos espaços periplasmático e citoplasmático de *E. coli*, formadas em decorrência da alta expressão de proteína heteróloga (Bowden et al., 1991). Os sedimentos obtidos da cultura de *E. coli* BL21 (DE3) transformada foram lavados, sonificados e centrifugados várias vezes em diferentes tampões, com o intuito de eliminar possíveis proteínas contaminantes. Esse procedimento gerou corpos de inclusão altamente enriquecidos; eles foram solubilizados com 8 M de uréia e submetidos ao protocolo de *refolding* pelo método de diálise. Após diálise, a preparação foi aplicada em coluna de N-acetilglicosamina imobilizada e purificada por afinidade, o que adicionalmente permitia constatar a preservação do domínio lectínico da proteína recombinante. A purificação teve um rendimento aproximado de 80 %, resultando na obtenção de proteína de massa molecular aparente esperada (figura 5 A).

A tecnologia IgY tem sido utilizada com sucesso para a produção de anticorpos específicos contra proteínas de mamíferos (Jintaridth et al., 2006) e de patógenos (Juliarena et al., 2007, Fan et al., 2006). Dispúnhamos de anticorpos IgY anti PCN; eles foram utilizados para avaliar o reconhecimento da rPCN, através da técnica de western blotting. Para tanto, uma alíquota da rPCN purificada após *refolding* foi aplicada em gel de poliacrilamida e submetida a procedimentos de eletroforese e eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. Anticorpos IgY anti-PCN revelaram a banda de 28 kDa, que corresponde à massa molecular de rPCN (figura 5 B).

Figura 5. Após o procedimento de *refolding* e purificação por afinidade a N-acetilglicosamina, rPCN foi reconhecida por anticorpos anti-PCN. **A:** A rPCN foi purificada e avaliada quanto a sua capacidade de ligação a N-acetilglicosamina em coluna de cromatografia. O material eluído da coluna foi submetido a SDS-PAGE 12 % em condições redutoras, e corado com azul de coomassie.. Linha 1: material antes do *refolding*. Linha 2: material após o *refolding*, apresentando banda proteica única, cuja massa molecular corresponde a 28 kDa. **B:** A rPCN purificada foi separada por SDS-PAGE, eletrotransferida para nitrocelulose e analisada quanto à reatividade IgY anti-PCN. A revelação da banda de 28 kDa indica que IgY anti-PCN reconhece a lectina recombinante. Marcadores moleculares são provenientes da mistura de marcadores pré-corados PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

4.3 A rPCN foi capaz de induzir a produção de TNF- α e óxido nítrico em macrófagos murinos

Vários estudos têm demonstrado que as citocinas exercem um papel crucial no curso da PCM humana (Benard et al., 2001 e Romano et al., 2002) e experimental (Arruda et al., 2004; Pina et al., 2004 e Souto et al., 2000). Em modelos murinos, resistência à PCM associa-se a ativação preferencial de células T *helper* 1 (Th1) (Calich e Kashino, 1998), cujo principal produto é IFN- γ (Schroder et al., 2004). Essa citocina ativa macrófagos e aumenta a produção de TNF- α por essas células. TNF- α , por sua vez, exerce um importante papel na defesa do hospedeiro contra fungos, por aumentar a permeabilidade do endotélio vascular e promover o acúmulo de macrófagos no tecido infectado, bem como sua diferenciação em células epitelióides, proporcionando a formação de granulomas organizados que restringem a disseminação de fungos (Figueiredo et al., 1993; Gonzalez et al., 2003 e Souto et al., 2000).

Nosso grupo constatara que PCN nativa, purificada por afinidade à N-acetilglicosamina-agarose (Coltri et al., 2006) ou à quitina particulada (dos Reis Almeida et al., 2010), induz a produção de TNF- α e óxido nítrico por macrófagos murinos elicitados. Assim, buscamos avaliar se rPCN reproduziria esses efeitos. Como mostra a figura 6, rPCN estimulou a produção de TNF- α (painel A) e de óxido nítrico (painel B) por células aderentes da cavidade peritoneal de camundongos, em níveis similares aos induzidos pela proteína nativa (PCN) e pelo controle positivo (LPS+IFN γ).

Figura 6: Macrófagos elicitados produziram TNF- α e NO em resposta ao estímulo com rPCN. Macrófagos peritoneais aderentes foram estimulados com PCN e rPCN na concentração de 0,25 μ g/mL, tendo LPS +IFN γ como controle positivo e apenas meio como controle negativo; **A:** produção de TNF- α , **B:** produção de NO, após 48 h de estímulo. O resultado é expresso como média e desvio padrão, calculados com base em triplicatas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ ou (***) $p < 0,001$.

4.4 A rPCN interagiu com laminina de maneira dependente do reconhecimento de carboidrato

Estudos anteriores mostraram que a interação com laminina pode estar envolvida na patogenicidade de *P. brasiliensis* (Vicentine et al., 1994 e González et al., 2005) e nosso grupo havia demonstrado que PCN nativa se liga à laminina de maneira dependente de dose e de reconhecimento de açúcar (Coltri e colaboradores, 2006; dos Reis Almeida, 2010). Esse resultado foi agora reproduzido ao analisarmos a interação de rPCN com laminina. Diferentes concentrações de rPCN biotinilada foram adicionadas a poços de uma microplaca revestidos com laminina. A ligação foi revelada pela adição de neutravidina conjugada a peroxidase. Como mostra a figura 7 A, a interação ocorreu de modo dose-dependente e foi parcialmente inibida na presença do açúcar específico, N-acetilglicosamina, enquanto que a D-galactose não teve nenhum efeito sobre a ligação, figura 7 B.

Figura 7: rPCN interagiu com laminina de maneira dependente de dose e do reconhecimento de açúcar. **A:** Diferentes concentrações da rPCN conjugada à biotina foram adicionadas a poços revestidos com laminina. A ligação foi revelada com TMB (tetrametilbenzidina) e a leitura feita a 450nm. O ensaio foi feito em triplicatas. **B:** amostras de rPCN forma incubadas com diferentes concentrações GlcNAc, D-glicose e D-galactose; a lectina foi então adicionada a poços revestidos com laminina. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. (*) $p < 0,05$.

4.5 rPCN foi dotada de atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase

A prévia demonstração de que PCN possui um sítio catalítico, com atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (dos Reis Almeida e colaboradores, 2010) motivou-nos a verificar se rPCN reproduziria essa propriedade da proteína nativa. Para tanto, a rPCN e PCN foram comparadas quanto à sua atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase. A figura 8 mostra que ambas as preparações foram ativas: rPCN apresentou atividade enzimática de 0,054 U/mL e atividade específica de 2,65 U/mg, enquanto que a PCN apresentou atividade enzimática de 0,041 U/mL e atividade específica de 2,05 U/mg (figura 8).

Figura 8: A rPCN foi dotada de atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase. As preparações de PCN e rPCN foram avaliadas seguindo o mesmo protocolo quanto a atividade de N-acetilglicosaminidase. A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro em $\lambda = 405$ nm. A margem de erro foi calculada através de análises em duplicatas.

4.6 Reconhecimento de leveduras de *P. brasiliensis* por anticorpos anti-rPCN

Para verificar se a IgY anti-rPCN era capaz de reconhecer a PCN em seu contexto natural, foi realizado um teste de imunofluorescência com leveduras de *P. brasiliensis* não permeabilizadas. A figura 9 mostra que a levedura foi marcada na maior parte da superfície celular, em particular nas regiões de brotamento (painel C e D) e nas células filhas (Painel G e H). A forma de pseudohifa visualizada na preparação foi predominantemente marcada na sua extremidade de crescimento (painel G e H). Este padrão de marcação foi observado tanto em levedura, como nas formas de hifas de *P. brasiliensis* (dados não mostrados), sendo similar a resultados anteriores obtidos com IgG murina produzido contra PCN nativa.

Figura 9. Anticorpos anti-rPCN reconheceram a lectina na superfície de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. **Painel A-D:** anticorpos anti-PCN. **Painel E-H:** anticorpos anti-rPCN. O reconhecimento de PCN utilizando ambos os anticorpos foi uniformemente observado sobre a superfície da célula leveduriforme, com marcação mais intensa em algumas regiões de brotamento.

Capítulo 2. Administração profilática ou terapêutica de rPCN em camundongos conferiu proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*

Com base em demonstração de que proteínas ligantes de carboidratos podem exercer ação imunomoduladora e conferir resistência contra infecções por patógenos intracelulares (Panunto-Castelo et al., 2001; Teixeira et al., 2006; Coltri et al., 2010; Cardoso et al., 2011; Ruas et al., 2012), investigamos se a administração profilática ou terapêutica da rPCN interferiria no curso da infecção com *P. brasiliensis*, de acordo com parâmetros bem estabelecidos de avaliação da PCM experimental murina.

4.7 Análise da histologia pulmonar

Através de abordagens morfométricas, o tecido pulmonar de camundongos BALB/c, submetidos a diferentes regimes de administração de rPCN, foi analisado quanto ao número e extensão de lesões granulomatosas, aos 30 dias de infecção com *P. brasiliensis*.

O número de granulomas foi menor entre camundongos aos quais rPCN havia sido administrado de forma profilática do que entre camundongos controles (não tratados). Dentre os diversos regimes de administração profilática, dois protegeram mais o hospedeiro. Os animais que receberam a rPCN no 10º dia antes da infecção (G3), e no dia 3º dia (G4), apresentaram menor número de granulomas do que os animais aos quais apenas veículo (PBS) foi administrado, como mostra a figura 10 B. Os pulmões dos animais do G3 apresentaram média de densidade de 0,65 granulomas/mm², sendo que o pulmão de um dos animais analisados estava livre de granuloma. A média da ocorrência de lesões granulomatosa nos animais do G4 foi de 0,41 granulomas/mm², contrastando com a média de 1,69 granulomas/mm² detectada nos animais controles. Além disso, os granulomas dos animais controles ocupam área mais extensa do que a verificada nos animais aos quais rPCN foi administrada. A única exceção é dada por G3 que, apesar de ter menos granulomas, estes ocupavam superfícies similares às verificadas nos controles (figura 10 C). Já os animais do G1, que receberam a proteína nos dias 17, 10 e 3 anteriores à infecção, apresentaram redução significativa da área ocupada por granulomas. Assim, houve variação na resposta de acordo com o regime adotado de administração profilática da rPCN, ainda que qualquer desses regimes tenha proporcionado menor comprometimento do tecido pulmonar em comparação a animais que receberam apenas PBS. Esses controles tiveram o parênquima pulmonar quase

totalmente substituído por extensas lesões granulomatosas contendo numerosas células fúngicas viáveis (figura 10 A) e apresentando densidade de 2,05 granulomas/mm² (figura 10 B). Nossos dados de histologia também mostraram que os animais do grupo controle, em alguns casos, não formaram granulomas compactos, o que resultou em disseminação do fungo para o baço e fígado, detectada aos 30 dias de infecção (dados não mostrados).

A análise morfométrica do tecido pulmonar de camundongos que receberam rPCN no protocolo terapêutico proporcionou evidências de redução significativa na incidência de granulomas aos 30 dias de infecção. A redução foi mais drástica nos animais dos G2, G3 e G4, que apresentaram, em média, 0,53 granulomas/mm², 0,48 granulomas/mm² e 0,58 granulomas/mm², respectivamente. A média verificada nos animais do G1 foi de 0,79 granulomas/mm². A média apresentada pelos animais do grupo PBS foi de 1,99 granulomas/mm² (figura 11 B). Além de apresentarem maior frequência de granulomas, os animais controles apresentaram maior extensão nas lesões do que a observada nos animais submetidos a qualquer um dos tratamentos adotados. Apenas a área de lesão observada nos animais do G4 foi similar à verificada nos animais controle; nos outros 3 grupos experimentais ocorreram reduções significativas. As áreas encontradas nos animais que receberam a rPCN no 3º, 10º e 17º dia após a infecção (G1), ou no 10º e 17º dia (G2), ou ainda no 10º dia (G3), foram 2,8; 1,8 e 2,2 vezes, respectivamente, menores em relação ao controle (figura 11 C).

Analisando os cortes histológicos, observamos que, independentemente do número de doses e dos dias em que a rPCN foi administrada, o regime terapêutico associou-se a menor comprometimento do tecido pulmonar em comparação ao pulmão dos animais controles que receberam apenas PBS. As imagens são condizentes com os dados de morfometria, mostrando que a incidência de lesões granulomatosas no pulmão dos animais do grupo PBS é significativamente maior, assim como a área que eles ocupam no tecido pulmonar (figura 11 A). As análises também mostraram que em alguns animais pertencentes ao grupo PBS não se visualizaram granulomas compactos, mas sim coalescentes (dados não mostrados).

Figura 10. A administração da rPCN em regime profilático associou-se a redução de lesões pulmonares próprias da PCM. A: Cortes histológicos do pulmão de camundongos distribuídos em grupos que foram submetidos a regimes diversos de administração profilática de rPCN e depois infectados com *P. brasiliensis*. G1: administração de rPCN ocorreu nos 17º, 10º e 3º dias antes da infecção; G2: 10º e 3º dia antes da infecção; G3: 10º dia antes da infecção; G4: 3º dia antes da infecção; PBS: animais que receberam apenas veículo (PBS) nos 17 º, 10 º e 3 º dia antes da infecção. Embora tenha havido variação na resposta entre os diferentes grupos tratados, a incidência **(B)** e a área **(C)** dos granulomas nos animais do grupo PBS são expressivamente maiores do que as detectadas nos animais tratados. A objetiva necessária à captura das imagens no pulmão dos animais do grupo PBS foi apenas de 10 X, enquanto nos outros grupos foi utilizada a objetiva de 20 X. A captura das imagens foi feita utilizando microscópio Carl Zeiss axiophot acoplado a uma câmera JVC TK1270 e ao computador, o qual tem o programa KS-400 v2.0 utilizado para determinação da densidade de granulomas. GMS: Gomori Methanamine Silver.

Figura 11. A administração de rPCN em regime terapêutico também associou-se à redução de lesões pulmonares próprias da PCM. A: Cortes histológicos do pulmão de camundongos distribuídos em grupos que foram submetidos a regimes diversos de administração terapêutica de rPCN e depois infectados com *P. brasiliensis*. G1: 3º, 10º e 17º dia após infecção; G2: 3º e 10º dia após infecção; G3: 10º dia após infecção; G4: 3º dia após infecção; PBS: animais que receberam apenas PBS no 3º, 10º e 17º dia após infecção. Embora tenha havido variação na resposta entre os diferentes grupos tratados, a incidência **(B)** e a área **(C)** dos granulomas nos animais tratados são expressivamente menores quando comparados aos animais não tratados. A captura das imagens foi feita utilizando microscópio Carl Zeiss axiophot acoplado a uma câmera JVC TK1270. Para mensuração das lesões no tecido pulmonar e da incidência das mesmas, foi utilizado o programa *Image J* (programa desenvolvido por Wayne Rasband do National Institute of Mental Health). GMS: Gomori Methanamine Silver.

4.8 A administração de rPCN reduziu a recuperação de células fúngicas (UFC) do pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*

Os resultados obtidos no ensaio de recuperação de colônia do tecido pulmonar nos permitiram definir, dentro os diferentes protocolos de administração de rPCN, quais os que mais beneficiaram o hospedeiro. A recuperação dos fungos foi avaliada pelo número de UFC obtidas do macerado do pulmão de animais com 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*.

No regime de administração profilática, as quantidades de colônias recuperadas dos pulmões dos camundongos dos G1, G2, G3 e G4 foram significativamente inferiores ($p < 0,0001$) às verificadas nos animais do grupo PBS, como mostra a figura 12 A. Diferentes números de doses ou de dias de administração de rPCN não implicaram em diferenças significativas entre a recuperação de leveduras do pulmão desses animais.

Resultados similares foram obtidos nos grupos submetidos ao regime terapêutico de administração de rPCN. Os animais tratados apresentaram redução significativa no número de UFC quando comparados aos animais do grupo PBS. Os animais do G2, que receberam a rPCN no 3º e 10º dia após a infecção, e os animais do G4, injetados no 3º dia após a infecção, tiveram as UFC reduzidas em 64 % e 67 %, respectivamente. Nos camundongos do G1, que receberam rPCN nos 3º, 10º e 17º dias após a infecção, houve redução de 56% na recuperação de colônias. A menor redução na recuperação das leveduras, mas que ainda foi significativa, ocorreu nos animais do G3 que foram injetados com a rPCN no 10º dia após a infecção. Em comparação ao número de leveduras recuperadas nos animais controles, no G3 houve recuperação de 52 %, figura 12 B.

Assim, nossos resultados demonstram que aos 30 dias de infecção, os camundongos que receberam a rPCN, seja profilática ou terapêuticamente, tinham eliminado mais fungos do que os animais não tratados, pertencentes ao grupo PBS.

Figura 12. O tratamento profilático ou terapêutico com rPCN resultou em redução da recuperação de leveduras do macerado pulmonar de animais no 30º dia de infecção com *P. brasiliensis*. As colônias fúngicas recuperadas do tecido pulmonar foram contadas e os resultados expressos como número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido. Cada grupo corresponde a 5 camundongos e os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ ou (****) $p < 0,0001$.

Capítulo 3. O efeito protetor da rPCN contra a infecção por *P. brasiliensis* associou-se a sua atividade imunomoduladora

Os resultados obtidos pelas análises histopatológica e de quantificação da carga fúngica de camundongos infectados com *P. brasiliensis* demonstram que a administração profilática ou terapêutica de rPCN confere resistência aos animais. Assim, passamos a investigar se tal efeito protetor seria atribuível a eventual ação imunomoduladora exercida por rPCN, a exemplo do que já se verificou com outras lectinas. A atividade imunomodulatória de rPCN foi avaliada pela comparação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar dos camundongos infectados, tratados ou não com a lectina recombinante.

Efeito da administração profilática e terapêutica com rPCN sobre os níveis pulmonares de citocinas na PCM murina

4.9 A administração de rPCN associou-se a níveis aumentados de IL-12 em camundongos infectados com *P. brasiliensis*

A dosagem de citocinas foi feita por ELISA no macerado do tecido pulmonar dos animais com 30 dias de infecção com *P. brasiliensis* e que foram tratados, ou não tratados, com rPCN, administrado em regime profilático ou terapêutico. Verificou-se que dentre os grupos que receberam rPCN profilático, os níveis de IL-12p40 e de IL-12p70 estavam significativamente aumentados nos animais do G3, que receberam a rPCN no 10º dia antes à infecção, e nos animais do G4, tratados no dia 3 antes da infecção, em relação ao controle. A produção de IL-12p40 foi três vezes maior no grupo tratado no 10º dia antes da infecção (G3) e nos animais tratados no 3º dia (G4), enquanto que a produção de IL-12p70 detectada nesses grupos, alcançou níveis quatro e três vezes superiores, respectivamente, aos detectados nos animais controles (figura 13 A e B, respectivamente).

Nos animais submetidos ao regime terapêutico de administração de rPCN, a produção de IL-12p40 foi significativamente maior em animais do G2 e G3. Em G2, os animais receberam rPCN 3 e 10 dias após a infecção, e os níveis de IL-12p40 foram 69 % superiores aos verificados nos controles. Em G3, os camundongos receberam uma única dose de rPCN 10 dias após a infecção e os níveis de IL-12p40 foram 58 % superiores aos detectados nos controles. (figura 13 C).

Como se sabe, a alta produção de IL-12 estimula células NK e macrófagos a secretarem elevados níveis de IFN- γ . Esta citocina, por sua vez, estimula a produção de altos níveis de TNF- α e NO, melhorando a atividade fungicida de fagócitos (Calich et al., 2008). Assim, os resultados obtidos sugerem que alguns dos regimes utilizados para administração da rPCN podem levar ao aumento da produção de IL-12 e favorecer a resistência do hospedeiro ao fungo.

Figura 13. Administração profilática ou terapêutica de rPCN associou-se a altos níveis de IL-12 no pulmão de camundongos com 30 dias de infecção com *P. brasiliensis*. **A e B:** níveis pulmonares de IL-12p40 e IL-12p70 em camundongos aos quais rPCN foi profilaticamente administrada. **C:** níveis pulmonares de IL-12p40 em camundongos aos quais rPCN foi administrada em regime terapêutico. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco animais e são representativos de 3 experimentos independentes. Os resultados foram considerados significativos quando (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) ou $p < 0,001$.

4.10 A administração de rPCN associou-se a níveis aumentados de TNF- α e IFN- γ em camundongos infectados com *P. brasiliensis*

Aos 30 dias de infecção, os animais que receberam a rPCN no 10º dia anterior à infecção (G3), e os que receberam rPCN apenas no 3º dia anterior à infecção (G4), apresentaram níveis pulmonares de TNF- α e IFN- γ superiores aos detectados nos animais não tratados. As concentrações de TNF- α eram cinco e duas vezes mais altas nos animais dos G3 e G4, respectivamente (figura 14 A). Já as concentrações de IFN- γ foram duas vezes mais altas no G3, e três vezes, no G4 (figura 14 B).

Dentre os animais do protocolo terapêutico, os níveis pulmonares de TNF- α só estavam significativamente aumentados no G4, em relação ao controle (figura 14 C). Quanto aos níveis de IFN- γ , os grupos que receberam a rPCN, 3, 10 e 17 dias após a infecção (G1), ou 3 e 10 dias (G2), ou ainda, os que receberam uma única dose no dia 10 (G3), mostraram discreto aumento em relação aos demais grupos. Dentre eles os que apresentaram menores níveis comparados ao controle, foram os G1 e G3, que tiveram aumento nos níveis de IFN- γ elevados em apenas 34 % e 33 %, respectivamente. Os níveis mais altos detectados no grupo terapêutico foram os do G2, cujo aumento foi de 42 % (figura 14 D).

Figura 14. Alguns protocolos de administração profilática e terapêutica de rPCN, associaram-se ao aumento dos níveis pulmonares de TNF- α e IFN- γ , em camundongos no 30º dia de infecção com *P. brasiliensis*. **A e B:** níveis de TNF- α e IFN- γ , respectivamente, detectada nos grupos que receberam rPCN em regime profilático. **C e D:** níveis de TNF- α e IFN- γ , respectivamente, detectada nos grupos que receberam rPCN em regime terapêutico. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco animais e são representativos de 3 experimentos independentes. Os resultados foram considerados significativos quando (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) ou $p < 0,001$.

4.11 A administração de rPCN associou-se a níveis aumentados de óxido nítrico em camundongos infectados com *P. brasiliensis*

Os níveis pulmonares de NO foram determinados nos animais dos diferentes grupos experimentais, utilizando a metodologia de Griess (Grenn et al., 1982), no 30º dia após a infecção com *P. brasiliensis*. Esse níveis estavam aumentados nos animais dos 4 grupos submetidos a regime profilático de administração de rPCN, em relação aos animais do grupo PBS (figura 15 A). Similarmente, camundongos submetidos ao regime terapêutico, obedecendo aos protocolos G2, G3 e G4, apresentaram altos níveis de NO. Nos animais injetados com rPCN aos 3 e 10 dias após a infecção (G2), os níveis foram 2,2 vezes superiores aos do grupo controle, índice também alcançado pelos animais que receberam a uma única dose de rPCN, 3 dias após a infecção (G4). O efeito da administração da rPCN 10 dias após a infecção (G3), resultou em níveis 2 vezes superiores aos do controle (figura 15 B). Em modelos experimentais de PCM, alguns autores conferem ao NO um papel exclusivamente protetor, enquanto outros mostram que a produção persistente e a alta de NO associa-se à supressão da resposta celular e aumenta a susceptibilidade ao fungo (Bocca et al., 1998; Gonzalez et al., 2000; Nascimento et al., 2002). Sugere-se que o NO exerça um papel protetor na fase inicial da infecção, mas seja deletério quando produzido no decorrer de toda a doença (Nascimento et al., 2002).

Figura 15: A administração profilática e terapêutica de rPCN associou-se ao aumento dos níveis pulmonares de óxido nítrico, em camundongos no 30º dia de infecção com *P. brasiliensis*. **A:** níveis pulmonares de NO detectados a nos camundongos submetidos ao regime profilático de administração de rPCN. **B:** níveis de NO, detectados nos grupos submetidos ao regime terapêutico de administração de rPCN. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco animais e são representativos de 3 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) ou $p < 0,001$.

4.12 Níveis pulmonares de IL-4 e IL-10 em camundongos aos quais rPCN foi administrada em regime profilático ou terapêutico, detectados aos 30 dias de infecção com *P. brasiliensis*

No trigésimo dia após a infecção, independentemente do regime adotado para administração de rPCN, os níveis de IL-4 foram semelhantes entre todos os grupos de camundongos, tratados, ou não, com rPCN. (figura 16 A e 16 C, respectivamente).

No que concerne aos níveis de IL-10, os animais do grupo que recebeu a rPCN nos 10º e 3º dias antes da infecção (G2), e do grupo que recebeu apenas uma dose no 10º dia (G3), apresentaram níveis significativamente maiores do que os verificados no grupo PBS (figura 16 B). Os animais do G2 produziram 7 vezes mais IL-10 do que os controles PBS. Nos animais do G3 os níveis pulmonares de IL-10 foram 6,6 vezes superiores aos do grupo controle.

Em relação aos animais submetidos ao regime terapêutico, apenas os animais do G2, que receberam rPCN 3 e 10 dias após a infecção, apresentaram níveis pulmonares de IL-10 quase 2 vezes superiores aos verificados nos animais do grupo controle (figura 16 D).

A produção aumentada de IL-10 pode contribuir para a homeostase da resposta imunitária do hospedeiro. O aumento de IL-10 nas 4 primeiras semanas de infecção experimental com *P. brasiliensis* faz com que mediadores inflamatórios atuem no sentido de favorecer a eliminação do fungo sem causar lesão inflamatória tissular.

Figura 16. A administração da rPCN não interferiu nos níveis pulmonares de IL-4, mas associase ao aumento dos níveis de IL-10, no 30º dia de infecção com *P. brasiliensis*. **A e B:** níveis de IL-4 e IL-10, respectivamente, detectados nos grupos submetidos ao regime profilático de administração de rPCN. **C e D:** níveis de IL-4 e IL-10, respectivamente, detectados nos grupos submetidos ao regime terapêutico. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco animais e são representativos de 3 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) ou $p < 0,001$.

Capítulo 4. A rPCN foi capaz de ativar receptores do tipo Toll (TLRs), e essa ativação possivelmente foi dependente do reconhecimento de carboidratos

Muitos dos ligantes dos TLRs foram identificados através de screenings com um grande número de PAMPs conhecidos, utilizando-se células embrionárias humanas HEK293T (*Human Embryonic Kidney cells*), transfectadas com TLRs. Essas células fornecem um modelo de transfecção valioso para esses estudos já que não expressam naturalmente nenhum dos TLRs (Hornung et al., 2002). Além disso, sabe-se que TLR1, 2 e 6 são altamente similares em termos de suas seqüências primárias e originaram-se de um evento de duplicação gênica (Hughes e Piontkivska, 2008).

A dimerização desses TLRs permite um reconhecimento mais refinado de uma ampla gama de componentes microbianos (Underhill et al., 1999). Utilizando-se do modelo de transfecção em células HEK293T, avaliamos se rPCN, como aparente indutora de resposta pró-inflamatória, seria capaz de ativar tais receptores e, dessa forma, favorecer o desenvolvimento da imunidade adaptativa apropriada para conferir proteção contra a PCM experimental.

4.13 A rPCN ativou diretamente TLRs

A produção de IL-8 por células HEK293T é um parâmetro indicativo de ativação de TLR transfectado.

Com o intuito de avaliar se a rPCN é capaz de ativar os TLRs, células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos contendo os genes que codificam os receptores TLR2/1, TLR2/6 e TLR4; diferentes concentrações da rPCN foram ensaiadas como estímulos à ativação dos receptores transfectados. No intervalo de 20 a 24 horas após o estímulo, o sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem de IL-8. Verificamos que rPCN estimulou a produção de IL-8 pelas células transfectadas com TLR2/1 (Figura 17 A), TLR2/6 (Figura 17 B) e TLR4 (Figura 17 C), em todas as concentrações testadas. Respostas ótimas, similares às obtidas com os respectivos agonistas, foram obtidas na concentração de 1,25 µg/mL de rPCN, concentração que foi adotada nos experimentos subsequentes. Demonstramos assim que rPCN interage diretamente com os TLRs ensaiados e que essa interação ativa o promotor gênico, culminando com a produção de IL-8. A interação de rPCN com TLRs pode ser responsável pela resposta protetora desencadeada frente à infecção por *P. brasiliensis* quando rPCN é administrada ao animal em regime profilático ou terapêutico.

Figura 17: rPCN ativou TLR2/1 (A), TLR2/6 (B) e TLR4 (C) transfectados em células HEK293T. As células foram transfectadas com plasmídeos contendo as sequências para a transcrição de TLR2, TLR1, TLR6, TLR4 ou com o plasmídeo vazio. Após transfecção, as células foram estimuladas entre 20 e 24 h, com diferentes concentrações de rPCN pré-incubadas por 1 h com polimixina, ou com os controles positivos sendo eles Pam(3)CysSk(4) para TLR2/1, FSL-1 para TLR2/6 ou LPS para TLR4. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação dos níveis de IL-8 por ELISA. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ ou (****) ou $p < 0,0001$. A análise estatística representa os dados comparativos entre o meio e a rPCN. Resultados representativos de três ensaios independentes.

4.14 A ativação de TLR2/1 e TLR2/6 por rPCN não foi dependente das moléculas acessórias CD14 e CD36

As moléculas acessórias CD14 e CD36 são correceptores que atuam na sinalização desencadeada pelos TLRs. Essas moléculas cooperam com os TLRs na indução de eventos apropriados à defesa do organismo.

Avaliamos o papel das moléculas correceptoras na resposta dos TLRs ao estímulo com rPCN. Para tanto transfectamos TLRs em células HEK293T, associando, ou não, a cotransfecção de moléculas CD14 e CD36. A resposta induzida por rPCN na concentração ótima (1,25 µg/mL) foi comparada às respostas induzidas por agonistas conhecidos desses receptores. A figura 18 A e 18 B mostra que células transfectadas com TLR2/1 ou TLR2/6, respectivamente, não tiveram sua ativação comprometida na ausência das moléculas acessórias. As respostas de produção de IL-8 foram similares na presença ou ausência de CD14 ou CD36. Nossos resultados demonstraram que as células quando transfectadas com TLR2/1 ou TLR2/6 se mantêm responsivas a rPCN, independente das moléculas de CD14 ou CD36, cuja ausência não compromete a sensibilidade às respostas induzidas por rPCN.

Figura 18. A ausência da co-transfecção de CD14 ou CD36 associada à transfecção de TLR2/1 ou tLR2/6, não comprometeu a ativação de tais receptores por rPCN. As células foram transfectadas com plasmídeos contendo as sequências para a transcrição de TLR2, TLR1 e TLR6, na presença ou ausência de CD14 e CD36. Após 48 h, as células foram estimuladas por 20 a 24 h, com rPCN que havia sido pré-incubada por 1 h com polimixina. Alternativamente, foram estimuladas com agonistas sintéticos conhecidos, utilizados como controles positivos: Pam(3)CysSk(4) para TLR2/1 e FSL-1 para TLR2/6. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem dos níveis de IL-8 por ELISA. **A:** células transfectadas com TLR2/1. **B:** células transfectadas com TLR2/6. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ ou (****) ou $p < 0,0001$. A análise estatística foi procedida no sentido de comparar os dados proporcionados pelo meio e rPCN. Resultados representativos de três ensaios independentes.

4.15 A falta de heterodimerização de TLR2 não comprometeu a ativação desencadeada por rPCN

O receptor TLR2 é único em sua capacidade de formar heterodímeros com TLR1 e TLR6 (Farhat et al., 2008). Avaliamos se a heterodimerização de TLR2 com TLR1 ou TLR6, é necessária para a ativação desencadeada por rPCN.

Células HEK293T foram transfectadas com CD14, CD36, TLR2, associando-se ou não à transfecção com TLR1 ou TLR6. Ativação celular decorrente do estímulo com rPCN foi similar em células co-transfectadas com TLR2/1 e TLR2/6 e em células transfectadas apenas com TLR2. Nossos resultados mostraram que no sistema de heterodimerização entre TLR2/1, a ausência de TLR1 discretamente compromete a produção de IL-8, com redução de 16 %. (figura 19 A). No que concerne a heterodimerização entre TLR2/6, a ausência de TLR6 diminui a produção de IL-8 em torno de 24 % (figura 19 B). Portanto, a heterodimerização de TLR2/1 e TLR2/6, constituem a melhor forma de apresentação do receptor na superfície da célula para que haja uma eficiente ativação induzida por rPCN. Embora a produção de IL-8 na ausência ou presença de TLR1 e TLR6, não compromete drasticamente a ativação das vias de sinalização que culminam com a produção de IL-8.

Figura 19. A homodimerização de TLR2 não comprometeu radicalmente a produção de IL-8 por rPCN. Células HEK293T foram transfectadas com CD14, CD36 na presença ou ausência de TLR2, TLR1 e TLR6. Após 48 h de transfecção, as células foram estimuladas com os respectivos agonistas (Pam(3)CysSk(4) para TLR2/1 e FSL-1 para TLR2/6), e com a rPCN previamente incubada com polimixina por 1 h. **A:** células transfectadas com TLR2 e TLR1. **B:** células transfectadas com TLR2 e TLR6. Os resultados foram considerados significativos quando (*) $p < 0,05$ ou (**) $p < 0,01$. Resultados representativos de cinco ensaios independentes.

4.16 A ativação de TLR2 por rPCN possivelmente foi dependente das glicosilações presentes no ectodomínio desse receptor

Considerando que a rPCN possui um CRD capaz de se ligar a carboidratos específicos, e que TLR2 possui quatro sítios de N-glicosilação em seu ectodomínio, nós supomos que glicana (s) N-ligadas a TLR2 possam corresponder a alvo (s) de reconhecimento por rPCN. Para testar essa hipótese, células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos contendo os mutantes de TLR2, de forma a expressar o receptor destituído de um ou mais sítios de N-glicosilação (mutantes gentilmente cedidos e gerados no laboratório do Dr. Nicholas Gay, Cambridge, UK). Somente os mutantes responsivos ao agonista FSL-1, foram estimulados com a rPCN, para evitar ensaiar mutantes que não sejam expressos na superfície celular. A ativação dos receptores foi avaliada através da produção de IL-8, como descrito nos ensaios anteriores. Como controle da ativação, células HEK293T foram transfectadas com TLR2 *wild type* (A6), que contem os 4 sítios de N-glicosilação. Verificamos que a produção de IL-8 foi significativamente comprometida em resposta ao estímulo por rPCN, quando as células foram transfectadas com 5 diferentes mutantes de TLR2 (figura 20). Analisando os sítios mutados que alteraram a produção de IL-8, observamos que a ausência do quarto sítio de glicosilação é o principal responsável pela diminuição dos níveis de IL-8. Possivelmente, ele corresponde ao alvo de reconhecimento por rPCN, e sua ausência compromete a ativação de TLR2. Esse resultado é evidenciado pela resposta observada nas células transfectadas com o mutante D6, que apresenta todos os sítio mutados exceto o 4 ° sítio de N-glicosilação. Nessas células a produção de IL-8 não apresenta diferença estatística se compararmos à produção de IL-8 nas células transfectadas com o receptor A6.

Figura 20. Diminuição dos níveis de ativação quando as células HEK293T são transfectadas com diferentes mutantes de TLR2. Células HEK293T expressando TLR2 com os 4 sítios de glicosilação (WT - não mostrado) ou os diferentes mutantes dos sítios de N-glicosilação, foram estimuladas com a rPCN. Os resultados foram obtidos pela análise comparativa entre o receptor mutante e o receptor WT. FSL-1 foi usado como controle positivo e meio como controle negativo (dados não mostrados). O sobrenadante após 20 h de estímulo foi utilizado no ensaio de ELISA para detecção de IL-8. Os sítios mutados (N-glicanas ausentes) estão representados pelos traços em vermelho, enquanto que os sítios preservados estão em preto. Resultados representativos de dois ensaios independentes.

Discussão

Demonstramos que a forma recombinante da paracoccina (rPCN) reproduz as atividades biológicas sabidamente exercidas pela proteína nativa. Além disso, conferiu proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*, provavelmente por modular a resposta imune para um padrão Th1.

Paracoccina (PCN) foi inicialmente descrita como um constituinte da fração ligante de N-acetilglicosamina (GlcNAc), do extrato de leveduras de *P. Brasiliensis*. PCN liga-se a laminina (Coltri et al., 2006), exerce atividade de NAGase (dos Reis Almeida, et al., 2010) e induz macrófagos a produzir TNF- α e óxido nítrico (Coltri et al., 2006; dos Reis Almeida et al., 2010). Tais atividades foram originalmente atribuídas a uma proteína de 70 kDa presente na fração ligante de GlcNAc. Com o auxílio de estudos proteômicos e moleculares, tais atividades foram atribuídas a uma proteína hipotética conservada de *P. brasiliensis* anotada no banco de dados do *Broad Institute* como PADG_03347.1. De modo muito semelhante à PCN, o produto do gene PADG_03347.1 foi capaz de se ligar a laminina, de induzir a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos e de exercer atividade de NAGase.

Estudos anteriores mostraram que a PCN apresenta efeitos interessantes sobre as células do sistema imunológico. Proteínas ligantes de carboidratos (ou lectinas) são sabidamente potenciais agentes imunomoduladores (Coltri et al., 2006) (Souza et al., 2013; Gooden et al., 2013). Esse conhecimento nos motivou a investigar o efeito da administração da rPCN no curso da PCM murina. Os protocolos da administração de rPCN foram baseados em trabalhos anteriores realizados com a lectina de planta ArtinM, cuja administração confere resistência à leishmaniose murina (Panunto-Castelo et al., 2001), e à PCM (Coltri et al., 2010). O efeito da rPCN foi avaliado quando administrada nas formas profilática ou terapêuticas, variando-se a quantidade de injeções e os intervalos de tempo entre elas.

As características gerais da PCM foram alteradas pela administração profilática e terapêutica de rPCN. A histopatologia pulmonar revelou menor incidência de granulomas. Estas estruturas são formadas por agregados organizados de macrófagos ativados circundados por linfócitos e fibroblastos. Em torno do granuloma, os fibroblastos produzem uma cápsula que ajuda a conter os agentes infecciosos, além de reduzir a disponibilidade de nutrientes para os mesmos. Os resultados de microscopia ótica dos pulmões também mostram que os granulomas foram menos numerosos nos animais dos grupos tratados com a rPCN antes (profilaxia) ou após (terapia) a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*. Ademais, estes se apresentaram menores em comparação aos observados nos animais controles. Dois grupos experimentais de administração profilática foram mais protegidos da infecção, constituídos de

animais que receberam a rPCN no 10º dia (G3) e no dia 3º dia antes da infecção (G4). Os pulmões dos animais do G3 apresentaram média de densidade de 0,65 granulomas/mm², sendo que um dos animais analisados, não apresentou granulomas. A média da incidência de lesões granulomatosas nos animais do G4 foi de 0,41 granulomas/mm², enquanto que os animais controles apresentaram em média 1,69 granulomas/mm². Assim as diminuições foram de 62 % e 76 %, respectivamente. Nos animais controles, os granulomas foram muito frequentes e ocuparam área maior do que a verificada nos grupos tratados. Além disso, os animais do grupo controle apresentaram o parênquima pulmonar quase todo substituído por grandes lesões, contendo numerosas células fúngicas viáveis e densidade de 2,05 granulomas/mm². Alguns animais do grupo controle não foram capazes de formar granulomas compactos, fato associado à disseminação do fungo para o baço e fígado (dados não mostrados).

A contenção ou progressão da PCM relaciona-se com a estrutura do granuloma formado. A formação do granuloma, por sua vez, depende da resposta imune do hospedeiro. A reação granulomatosa representa uma tentativa de bloquear e conter a infecção pelo fungo, prevenindo sua multiplicação e sua disseminação para os tecidos (Fortes et al., 2011). A formação de granulomas compactos, com poucas células fúngicas, é observada em pacientes com a doença crônica localizada. Em pacientes com a forma aguda, as lesões são geralmente desorganizadas. O mesmo ocorre em animais imunodeprimidos, os quais apresentam baixos níveis de IFN- γ , produção de citocinas do padrão Th2 e doença progressiva com a formação de muitas lesões granulomatosas desorganizadas (Moscardi Bacchi et al., 1994; Cano et al., 1995; Del Sero et al., 1999).

O efeito positivo exercido pela administração da rPCN também se refletiu na recuperação de colônias fúngicas nos pulmões. A literatura descreve que a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) é um parâmetro confiável de avaliação do curso da infecção em direção à progressão ou à cura. Permite discriminar animais resistentes de susceptíveis (Clemons et al., 2005). A queda do número de colônias recuperadas dos pulmões dos animais infectados é um traço de resistência a *P. brasiliensis*. Nossos resultados mostraram que a recuperação de células fúngicas viáveis foi significativamente reduzida em todos os grupos experimentais analisados. Isto ocorreu independente do número de doses e dos dias em que esses animais foram tratados com a rPCN. A quantidade de colônias recuperadas dos pulmões dos camundongos tratados profilaticamente foi em torno de 76 % menor que a obtida nos pulmões dos animais que receberam apenas PBS. Esse parâmetro foi

anteriormente utilizado para avaliar o efeito da imunização com a rPb27, uma proteína de *P. brasiliensis*: camundongos imunizados reduziram UFC no pulmão, quando comparados aos animais não imunizados. Além disso, os animais imunizados reduziram drasticamente o número de granulomas no órgão (Fernandes et al., 2008).

A ação benéfica da rPCN também foi observada quando a proteína foi administrada seguindo protocolo terapêutico. As análises de morfometria do pulmão dos animais mostraram redução significativa na incidência de granulomas no tecido pulmonar de todos os grupos terapêuticos. Os animais do grupo controle apresentaram maior frequência de granulomas, que ocupavam maior área do órgão do que a observada nos animais tratados com rPCN. A análise dos cortes histológicos mostrou que o comprometimento do tecido pulmonar foi menor do que a verificada no pulmão dos animais controles, independentemente do regime da terapia. O desenvolvimento da PCM nos camundongos tratados com rPCN foi muito semelhante ao ocorrido em animais aos quais a lectina ArtinM foi administrada (Coltri et al., 2010) ou o peptídeo 10 da gp 43 (Travassos e Taborda, 2012). Este padrão de resposta também é observado em pacientes com a forma benigna da PCM, facilmente tratada através da terapia com anti-fúngicos (Marques et al., 2006; Fortes et al., 2011).

As diferentes manifestações clínicas da PCM são decorrentes do tipo e do grau de resposta desenvolvida contra *P. brasiliensis* (Ramos e Saraiva, 2008; Bernard, 2008). As formas benignas da PCM humana são consistentemente associadas com o desenvolvimento polarizado da imunidade Th1, uma resposta que é considerada essencial para conferir resistência em animais com infecções fúngicas experimentais (Calich e Kashino, 1998; Netea et al., 2004; Zhang et al., 2009; Ito, 2011). Já a imunidade Th2 está associada com as formas grave e disseminada da doença. Essas características estão bem estabelecidas não só para os modelos experimentais de PCM (Calich e Kashino, 1998; Ruas et al., 2009) mas também para criptococose (Müller et al., 2007) e candidíase (Netea et al., 2004; Haraguchi et al., 2010). Em decorrência dos resultados até então apresentados, investigamos se a rPCN estaria modulando a resposta dos camundongos e interferiria na PCM experimental por restaurar resposta imune adequada nos animais. Para tanto, comparamos os níveis de citocinas pró-inflamatórias detectados no homogenato pulmonar dos animais tratados e controles.

Nossos resultados mostraram que aos 30 dias de infecção, os camundongos que receberam uma única dose no dia 10 (G3) ou no dia 3 (G4) antes da infecção, tinham os maiores níveis de citocinas Th1 e de NO. Resultados muito similares foram obtidos pelos animais que receberam a rPCN no 3º e 10º dia (G2) após a infecção, e os que receberam

apenas uma dose no 10º dia (G3). Nesses animais, os níveis de IL-12 e IFN- γ foram maiores quando comparados aos detectados em tecido de animais controles. O aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias nos animais que receberam a rPCN, antes ou após a infecção, associou-se a menor recuperação fúngica e menor comprometimento do tecido pulmonar. Esses dados sugerem que a administração de rPCN gera um microambiente pró-inflamatório, que possivelmente contribui para uma melhor resolução da PCM. Nossos resultados corroboram com os dados da literatura que demonstram que a resistência à infecção relaciona-se à produção de interferon-gama e de outras citocinas de padrão Th1 (Cano et al., 1998; Gonzalez et al., 2000; Souto et al., 2000).

A citocina IL-12 é capaz de induzir células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ (Chan et al., 1991; Gazzinelli et al., 1993); é crítica no desenvolvimento de células Th1 CD4⁺ (Hsieh et al., 1993). Estudos mostraram que o tratamento de camundongos com IL-12 no início da infecção com *Cryptococcus neoformans*, *C. immitis* ou *Histoplasma capsulatum* proporciona proteção aos animais. A administração de IL-12 leva ao aumento da produção de IFN- γ , enquanto que os controles não tratados produzem predominantemente IL-4 (Clemons et al., 1994; Kawakami et al., 1996; Kawakami et al., 1997; Zhou et al., 1997; Magee e Cox, 1996), citocina que se associa à susceptibilidade à infecção.

A contribuição do IFN- γ na imunidade protetora contra fungos foi demonstrada em várias micoses sistêmicas, tais como as causadas por *H. capsulatum* (Cain e Deepe, 1998; Allendoerfer e deepe, 1997), *C. neoformans* (Hoag et al., 1997), *P. brasiliensis* (Cano et al., 1998; Souto et al., 2000) e *Candida albicans* (Fava-neto et al., 1969; Kaposzta et al., 1998; Balish et al., 1998). IFN- γ desempenha papel fundamental contra vários agentes patogênicos (Nakamura et al., 1994; Gazzinelli et al., 1992; Denis, 1991), incluindo células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Brummer et al., 1988), através da ativação de macrófagos. A atividade fungicida de neutrófilos contra *Blastomyces dermatitidis* (Morrison et al., 1987) e *P. brasiliensis* (Kurita et al., 1999), bem como dos macrófagos contra o *H. capsulatum* (Brummer et al., 1991) e *P. brasiliensis* (Brummer et al., 1988; Calvi et al., 2003), é aumentada por IFN- γ , sugerindo que essa citocina desempenhe relevante papel na atividade fagocíticas destas células, assim como no controle da infecção fúngica (Nishikaku, et al., 2011). A administração de quantidades elevadas de anticorpos anti-IFN- γ a camundongos infectados, resultou no aumento da carga fúngica, ainda que os animais não sucumbissem à infecção (Cano et al., 1998). Animais nocautes para IFN- γ não resistem à infecção por *P. brasiliensis*, pela ocorrência de rápida disseminação do fungo, contrastando com a resistência

verificada em camundongos *WT*. A histopatologia pulmonar dos animais nocautes para IFN- γ revelou células fúngicas espalhadas por toda a extensão do órgão, refletindo sua incapacidade de conter e controlar a infecção (Souto et al., 2000). Também foi avaliada a localização de IFN- γ em granulomas desenvolvidos no peritônio de camundongos infectados. Detectou-se IFN- γ em células localizadas principalmente na periferia dos granulomas, circunscrevendo macrófagos, células epitelióides e células gigantes ao redor dos fungos e no centro das lesões (Nishikaku et al., 2011). Em fase mais tardia da infecção, houve maior detecção de IFN- γ em camundongos resistentes quando comparados a camundongos susceptíveis. Assim, há mecanismos de proteção envolvidos no controle da disseminação fúngica, relacionados à maior ativação dos fagócitos (Calich et al., 1998; Nishikaku et al., 2011). Também foi demonstrada a presença de IFN- γ em células das lesões cutâneas de PCM humana, evento associado à ocorrência de granulomas bem organizados e à manutenção da resposta imune celular (Pagliari e Sotto, 2003).

Sabe-se que IFN- γ promove a síntese de TNF- α por macrófagos (Beutler et al., 1986) e que essas citocinas atuam sinergicamente para induzir atividade anti-microbiana em muitas doenças infecciosas (Corradin et al., 1991; Leenen et al., 1994). Na infecção por *P. brasiliensis* em animais nocautes para IFN- γ , a capacidade de produzir TNF- α é muito reduzida; isso explica a falha de resistência desses animais à infecção fúngica, já que TNF- α é sabidamente importante na formação e manutenção dos granulomas (Kindler et al., 1989; Deckert-Schluter et al., 1998). TNF- α é um importante mediador da cascata molecular que conduz à inflamação crônica. Ele induz a produção de quimiocinas, que resulta no recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção, na regulação positiva da expressão de moléculas de adesão no endotelial vascular (Phillips e Weinblatt, 2005). Animais geneticamente modificados que não expressam TNF- α têm a formação de granulomas muito alterada, com deficiência na arquitetura característica dessas lesões e ocorrência de extensas regiões de necrose e infiltração neutrofílica (Bean et al., 1999). A deficiência congênita do receptor de TNF- α , p55, compromete a resposta protetora de camundongos infectados com *P. brasiliensis*. A geração de NO é alterada por essa deficiência, fato sugestivo de que TNF- α possa participar na geração de NO, que contém a disseminação fúngica, mas também atua como imunossupressor nas infecções causadas por *Pb18* (Souto et al., 2000). A infecção de animais deficientes de iNOS, permitiu observar que na ausência da enzima, há um desvio pronunciado da resposta imunológica para o padrão Th1. A redução da carga fúngica foi concomitante à ocorrência de altos níveis de TNF- α , aumento da migração de células T e

ativação de macrófagos pulmonares, que subsequentemente, originaram granulomas bem-compactos (Bernardino et al., 2013). Pacientes com PCM produzem baixos níveis de TNF- α , reforçando a idéia de que essa citocina seja importante no controle e no desenvolvimento da doença (Bava et al., 1991).

A ativação da imunidade gera fortes sinais pró-inflamatórios, indutores de reação inflamatória que contribui para a defesa do hospedeiro. Com a eliminação do patógeno, subsequentes sinais anti-inflamatórios são responsáveis pela resolução da inflamação (De Waal Malefyt, et al., 1991). Estes sinais são cruciais, não apenas para o retorno do sistema imunológico ao seu estado de equilíbrio homeostático, mas também para a proteção do hospedeiro contra os efeitos deletérios de uma intensa inflamação e para o reparo do tecido subsequente (Cohen et al., 2002).

Nossos resultados mostraram que os camundongos dos grupos profiláticos G2 e G3, assim como os camundongos do grupo terapêutico G2, não apresentaram inflamação exacerbada. Este fato pode decorrer dos níveis pulmonares elevados de IL-10, visto que esta citocina previne lesões inflamatórias que seriam provocadas por resposta Th1 exacerbada (Cyktor e Turner et al., 2011). O efeito protetor de IL-10 foi observado quando a lectina ArtinM foi administrada profilaticamente em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Os autores propõem que tal resposta resulte da interação de ArtinM com TLR2 expresso em células da imunidade inata (Coltri et al., 2010). Como já descrito na literatura, a sinalização via TLRs está envolvida em dupla via. Primariamente induz uma reação inflamatória e, secundariamente ativa mecanismos anti-inflamatórios (Netea et al., 2006). Estas observações podem explicar os resultados obtidos pela administração da rPCN.

Os níveis de citocinas pulmonares embasaram a suposição de que rPCN interaja com receptores glicosilados na superfície das células do sistema imunológico, levando em última análise, a uma resposta protetora em animais infectados com *P. brasiliensis*. Dentre os receptores glicosilados, os TLRs são críticos na ativação de células da imunidade inata com subsequente produção de mediadores. Tais mediadores contribuem para a eliminação do agente patogênico, além de controlar mecanismos essenciais que induzem e regulam a resposta imune adaptativa. A importância dos mediadores para a eliminação microbiana inclui o recrutamento de fagócitos para o local da infecção, a morte microbiana e na ativação de células dendríticas (DCs), dotadas de grande capacidade de induzir a ativação de células T (Reis e Sousa, 2004). Esses eventos resultam da capacidade de receptores do tipo Toll de reconhecer estruturas moleculares amplamente compartilhadas por patógenos, conhecidas

como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Kawai e Akira, 2011). O conhecimento sobre a importância do envolvimento desses receptores no reconhecimento de estruturas conservadas em *P. brasiliensis* advém da observação de que animais nocautes para MyD88 são incapazes de controlar o crescimento de *P. brasiliensis*, apresentando baixos níveis de IL-12, óxido nítrico, MCP-1, e de terem o tempo de sobrevivência reduzido frente a infecção. Comparados com animais selvagens, os nocautes desenvolvem infecção pulmonar mais grave, disseminação de células fúngicas para o fígado e baço, formação de granulomas coalescentes, não organizados (Loures et al., 2011).

Atualmente na literatura há uma única descrição da interação de TLRs com uma glicoproteína de *P. brasiliensis*, a gp43. Foi demonstrado que a interação desta glicoproteína com monócitos pode afetar a imunidade inata. Isso ocorre por um mecanismo de modulação da expressão de TLR2, TLR4 e MR (Mannose Receptor), assim como a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Nakaira-Takahagi et al., 2011). Nosso trabalho demonstrou que a rPCN ativa TLR2 e TLR4, o que pode representar o mecanismo pelo qual a lectina recombinante induz a produção de IL-10 e IL-12 quando administrada *in vivo*, gerando proteção aos animais contra a PCM. Esses dados são coerentes com a literatura, que demonstra que a ativação de TLR4 estimula fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias (Van der Kleij et al., 2002; Diterich et al., 2003), enquanto TLR2 está associado a liberação de IL-10 (Nigou et al., 2001).

Diferentemente dos outros TLRs descritos, TLR2 possui a característica peculiar de heterodimerizar na superfície das células com TLR1 ou TLR6. Tal propriedade é responsável por ampliar o repertório de reconhecimento de ligantes microbianos (Farhat et al., 2008). Nossos dados mostraram que rPCN, nas menores concentrações testadas, ativou ambas as formas heterodiméricas, TLR2/1 e TLR2/6, de modo muito similar ao agonista. De modo geral, ligantes microbianos, interagem predominantemente com um dos heterodímeros de uma das formas variáveis de TLR2 (Oosting et al., 2011; Chang et al., 2007; Henneke et al., 2005; Abe et al., 2010). A heterodimerização de TLR2 e TLR1 ocorre em resposta a lipídeos triacilados de bactérias gram-negativas, enquanto lipídeos diacilados de bactérias gram-positivas são reconhecidos por TLR2/6 (Takeuchi et al., 2002; Takeuchi et al., 2001). Além de PAMPs bacterianos, TLR2, hetero ou homodimerizado, reconhece moléculas de fungos e protozoários. Um clássico exemplo de PAMP fúngico é o zimosan extraído a partir da membrana celular de leveduras, que induz sinalização através de TLR2/6 (Kataoka et al., 2002; Underhill et al., 1999).

Embora se saiba que TLRs liguem-se diretamente certo conjunto de PAMPs (Bell et al., 2005; Iwaki et al., 2002; Lien et al., 2000; Mizel et al., 2003; Poltorak et al., 2000), há moléculas adicionais que aumentam o reconhecimento e a sinalização por alguns receptores do tipo Toll. Notavelmente, TLR4 forma um complexo na membrana celular com várias moléculas solúveis e/ou ligadas a membrana, incluindo CD14 e MD-2. CD14 também medeia a sinalização via TLR2 frente a muitos PAMPs, incluindo peptidoglicanos e lipopeptídeos, atuando na transferência desses ligantes para o receptor (Vasselon et al., 2004; Wetzler, 2003; Wooten et al., 1998). No que diz respeito ao reconhecimento de lipídeos diacilados via TLR2/6, CD36 é necessário para uma robusta ativação de NF- κ B, que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como para o *clearance* de bactérias gram-positivas (Hoebe et al., 2005). Embora seja desconhecido o mecanismo pelo qual CD36 aumenta a resposta aos ligantes específicos de TLR2, sabe-se que ele pode funcionar de modo análogo a CD14, aproximando os ligantes do receptor e, dessa forma, facilitando a sinalização (West et al., 2006). Em nossos estudos, CD14 e CD36 não tiveram um papel essencial na produção de IL-8 quando células HEK293T foram estimuladas com a rPCN. A ausência desses correceptores não comprometeram o reconhecimento e a ativação de TLR2/1 e TLR2/6 por rPCN, sugerindo que possa haver um reconhecimento direto pela lectina recombinante dos carboidratos presentes nestes receptores.

Pudemos constatar que a rPCN ativa ambos os heterodímeros de TLR2, e sendo assim, avaliamos se a lectina recombinante tem preferência por uma formação específica para desencadear a sinalização. Observamos que independente da forma como TLR2 se apresenta, homo ou heterodimérico, a rPCN desencadeia respostas muito similares de produção de IL-8 em todas as combinações formadas pelo receptor. Tais resultados são coerentes com dados da literatura, que descrevem que TLR2 pode reconhecer alguns ligantes na sua forma homodimérica ou se heterodimerizando com outras moléculas diferentes de TLR (Massari et al., 2002; Wetzler, 2003).

Embora não tenhamos dados refinados sobre a especificidade de reconhecimento de açúcar da rPCN, temos observado regularmente que ela tem afinidade por N-acetilglicosamina, o que nos permite supor que as atividades promovidas por esta lectina recombinante ocorra pela via de reconhecimento de carboidratos através do seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD – Carbohydrate Recognition Domain). Sabe-se que TLR2 e TLR4 possuem em seu ectodomínio, 4 e 9 sítios de N-glicosilação, respectivamente. Eles são importantes para a função e secreção dessas moléculas na superfície celular (Weber

et al., 2004; Correia e Ulevitch, 2002). Nos ensaios de ativação, utilizando mutantes para os sítios de N-glicosilação de TLR2, verificamos que a rPCN induz produção de IL-8 por reconhecer N-glicanas presentes no ectodomínio do receptor. Embora a estrutura molecular dos carboidratos presentes no ectodomínio de TLR2 humano ainda não tenha sido resolvida, nossos resultados sinalizam a importância da quarta glicana, que se revelou importante no reconhecimento de TLR2 por rPCN culminando com a produção de IL-8.

Considerando-se o aumento da incidência de infecções fúngicas, o desenvolvimento de imunoterapias que protejam contra essas doenças têm se tornado de grande importância para a saúde pública (Goes et al., 2005). O tratamento anti-fúngico hoje utilizado pode causar toxicidade, exigir longos períodos de tratamento que levam o paciente a abandonar a medicação e a recorrência da doença (Camargo et al., 1989). Também sabemos que o controle a longo prazo e a eventual esterilização do paciente, envolve obrigatoriamente o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Diante dessas dificuldades, novas abordagens para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas são necessárias. Uma vez que substâncias imunomoduladoras podem induzir respostas celulares adequadas ao desenvolvimento de resistência contra patógenos intracelulares, nossos resultados indicam que a rPCN possa ser de utilidade no controle da PCM, aplicabilidade esta que pode-se estender a outras doenças cuja imunidade protetora dependa da indução de uma resposta de padrão Th1. Lectinas dotadas de atividades imunomoduladoras e capazes de favorecer o desenvolvimento de imunidade correspondem a agentes imunoterápicos de grande interesse no controle de infecções fúngicas.

Conclusões

Diante dos nossos resultados, podemos concluir que:

- O gene PADG_03347 codifica a proteína paracoccina (PCN), sabidamente dotada de propriedades lectínica (ligante de N-acetil glucosamina) e enzimática (N-acetil glucosaminidase);
- A proteína recombinante (rPCN) reproduz as atividades biológicas da proteína nativa;
- A administração profilática ou terapêutica da rPCN em camundongos confere proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*, manifesta por menores extensões e menor densidade das lesões granulomatosas e redução de CFU pulmonares, em relação a camundongos não tratados;
- A administração profilática ou terapêutica de rPCN em camundongos infectados associa-se a aumento dos níveis pulmonares de mediadores próprios de imunidade Th1 e da citocina anti-inflamatória IL-10;
- A observação de que rPCN interage com os receptores de tipo Toll TLR2 e TLR4 origina a hipótese de que tal interação esteja implicada no efeito imunomodulador de rPCN;
- rPCN tem potencial aplicabilidade na imunoterapia da paracoccidiodomicose.

Referências Bibliográficas

1. Abe, T., Shimamura, M., Jackman, K., Kurinami, H., Anrather, J., Zhou, P., Iadecola, C. (2010) Key role of CD36 in Toll-like receptor 2 signaling in cerebral ischemia. *Stroke*. 41(5):898-904.
2. Ajello, L., Polonelli, L. (1985) Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *Eur. J. Epidemiol.* 1: 160–165.
3. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nat.* 404(6774):193-197.
4. Akita, E.M., Nakai, S. (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods*. 160: 207-214.
5. Akita, E.M., Nakai, S. (1992) Immunoglobulins from eggs yolks: isolation and purification. *Food Sci* 57: 629–634.
6. Allendoerfer, R., Deepe, G.S. Jr. (1997) Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect. Immun.* 65:2564–2569.
7. Anspach, F.B., Hilbeck, O. (1995) Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J. Chromatogr.* 711:81-92.
8. Arango, M., Yarzabal, L. (1982) T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopath.* 20(79): 115-123.
9. Aravind, L., Dixit, V.M., Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* 24:47–53.
10. Arruda, C., Valente-Ferreira, R.C., Pina, A., Kashino, S.S., Fazioli, R.A. Vaz, C.A.C., Franco, M.F., Keller, A.C., Calich, V.L.C. (2004) Dual role of interleukin- 4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect. Immun.* 72: 3932-3940.
11. Bagagli, E., Theodoro, R.C., Bosco, S.M., McEwen, J.G. (2008) Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopath.* 165:197-207.
12. Balish, E., Wagner, R.D., Vazquez-Torres, A., Pierson, C., Warner, T. (1998) Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma2/2) mice. *J. Infect. Dis.* 178:478–487.
13. Bava, A.J., Mistchenko, A.S., Palacios, M.F., Estevez, M.E., Tiraboschi, N.I., Sen, L., Negroni, R., Diez, R.A. (1991) Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.* 35(3):167-174.
14. Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D., Britton, W.J. (1999) Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.* 162: 3504–3511.
15. Bell, J.K., Botos, I., Hall, P.R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D.M., Davies, D.R. (2005). The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:10976–10980.
16. Bellissimo-Rodrigues, F., Machado, A.A., Martinez, R. (2011) Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85(3): 546-550.

17. Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., Romani, L. (2004) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J. Immunol.* 72: 3059–3069.
18. Benard, G. (2008) An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopath.* 165:209-221.
19. Benard, G., Romano, C.C., Cacere, C.R., Juvenale, M., Mendes- Giannini, M.J., Duarte, A.J. (2001) Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 13: 248-252.
20. Benard, G., Mendes-Giannini, M.J., Juvenale, M., Miranda, E.T., Duarte, A.J. (1997) Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.* 175: 1263–1267.
21. Bernardino, S., Pina, A., Felonato, M., Costa, T.A., Frank de Araújo, E., Feriotti, C., Bazan, S.B., Keller, A.C., Leite, K.R., Calich, V.L. (2013) TNF- α and CD8+ T Cells Mediate the Beneficial Effects of Nitric Oxide Synthase-2 Deficiency in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(8): e2325. doi:10.1371/journal.pntd.0002325.
22. Beutler, B.A. (2009) TLRs and innate immunity. *Blood.* 113:1399-1407.
23. Beutler, B., Tkacenko, V., Milsark, I., Krochin, N., Cerami, A. (1986) Effect of interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 164: 1791-1796.
24. Bedoya, V., McEwen, J., Tabares, A.M., Uribe, F., Restrepo, A. (1986) Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a histopathological study of the experimental murine infection. *Mycopath.* 94: 133-134.
25. Blasius, A.L., Beutler, B. (2010) Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 26;32(3): 305-315.
26. Bocca A.L., Hayashi, E.E., Pinheiro, A.G., Furlanetto, A.B., Campanelli, A.P., Cunha, F.Q., Figueiredo, F. (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 161:3056– 3063.
27. Bonfim, C.V., Mamoni, R.L., Blotta, M.H. (2009) TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol. Nov*;47(7):722-733.
28. Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X., Walmsley, A.R. (2002) The pathology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 10(2): 80-87.
29. Botas-Velasco, M., Jover-Díaz, F., Ortiz de la Tabla-Duccase, V., Martínez-García, C. (2010) Imported paracoccidioidomycosis in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28: 259–260.
30. Bousquet, A., Dussart, C., Drouillard, I., Charbel, E.C., Boiron, P. (2007) Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis. *Med. Mal. Infect.* 37(Suppl. 3): S210–4.
31. Bowden, G. A., Paredes, A.M., Georgiou, G. (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bio Tech.* 9, 725–730.
32. Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M. (2010) TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent.Res.* DOI: 10.1177/0022034510381264.
33. Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A. (1999) Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* 57(8): 2289-2294.

34. Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. Rev. 6: 89–117.
35. Brummer, E., Kurita, N., Yoshida, S., Nishimura, K., Miyaji, M. (1991) Killing of *Histoplasma capsulatum* by gamma- interferon-activated human monocyte-derived macrophages: evidence for a superoxide anion-dependent mechanism. J. Med. Microbiol. 35: 29–34.
36. Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A. (1988) In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophage by IFN-g for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatidis*. J. Immunol. 140:2786–2789.
37. Buitrago, M.J., Bernal-Martinez, L., Castelli, M.V., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M. (2011) Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review and diagnosis. J. Travel. Med. 18:26-33.
38. Cain, J.A., Deepe, G.S. Jr. (1998) Evolution of the primary immune response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung. Infect Immun. 66(4):1473-1481.
39. Calich, V.L.G., Costa, E.T.A., Felonato, M., Arruda, C., Bernardino, S., Loures, F.V., Ribeiro, L.R.R., Valente-Ferreira, R.C., Pina, A. (2008) Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopath. 165:223–236, 2008.
40. Calich, V.L.; Kashino, S.S. (1998) Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz. J. Med. Biol. Res. 31: 615-623.
41. Calich, V.L., Kipnis, T.L., Mariano, M., Neto, C.F., Da Silva, W.D. (1979) The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and posible significance for an in vivo model of infection. Clin. Immunol. Immunopathol., v. 12, p. 21-30.
42. Calvi, S.A., Peraçoli, M.T., Mendes, R.P., Marcondes-Machado, J., Fecchio, D., Marques, S.A., Soares, A.M. (2003) Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect. 5:107-113.
43. Calvi, S.A., Soares, A.M., Peraçoli, M.T., Franco, M., Ruiz, R.L. Jr., Marcondes-Machado, J., Fecchio, D., Mattos, M.C., Mendes, R.P. (2003) Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. Microbes Infect. 5: 373–379.
44. Camargo, Z.P., Unterkircher, C., Travassos, L.R. (1989) Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J. Med. Vet. Mycol. 27:407–414.
45. Campanelli, A.P., Martins, G.A., Souto, J.T., Pereira, M.S., Livonesi, M.C., Martinez, R., Silva, J.S. (2003) Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. J Infect Dis 187: 1496-1505.
46. Cano, L.E., Kashino, S.S., Arruda, C., Andre, D., Xidieh, C.F., Singer-Vermes, L.M., Vaz, C.A., Burger, E., Calich, V.L. (1998) Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect. Immun. 66: 800–806.
47. Cano, L.E., Singer-Vermes, L.M., Vaz, C.A., Russo, M., Calich, V.L. (1995) Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. Infect. Immun. 63:1777–1783.

48. Cardoso, M. R., Mota, C. M., Ribeiro, D. P., Santiago, F. M., Carvalho, J. V., Araujo, E. C., Silva, N. M., Mineo, T. W., Roque-Barreira, M. C., Mineo, J. R., Silva, D.A. (2011) ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. *Vaccine*. 9183-9193.
49. Castro, N.D., Castro, K.P., Orlandi, V., Feitosa, L.S., Rosa E Silva, L.K., Vainstein, M.H., Bão, S.N., Val, M., Soares, M.C.A. (2009) Characterization and functional analysis of the β -1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 9: 103–114.
50. Chan, S.H., Perussia, B., Gupta, J.W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H.A., Wolf, S.F., Trinchieri, G. (1991) Induction of interferon γ production by natural killer stimulatory factor: Characterization of the responder cell and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 1; 173 (4): 869-879.
51. Chang, S., Dolganiuc, A., Szabo, G. (2007) Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J. Leukoc. Biol.* 82(3):479-487.
52. Clemons, K.V., Espiritu, M., Parmar, R., Stevens, D.A. (2005) Comparative efficacies of conventional amphotericin b, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ;49(12):4867-75.
53. Clemons, K.V., Brummer, E., Stevens, D.A. (1994) Cytokine treatment of central nervous system infection: Efficacy of IL-12 alone and in synergy with conventional antifungal therapy in experimental cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 460–465.
54. Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420: 885–891.
55. Coltri, K.C., Oliveira, L.L., Ruas, L.P., Vendruscolo, P.E., Goldman, M.H., Panunto-Castelo, A., Roque-Barreira, M.C. (2010) Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Medical Mycology*. 48:792–799.
56. Coltri, K.C., Oliveira, L.L., Pinzan, C.F., Vendruscolo, P.E., Martinez, R., Goldman, M.H., Panunto-Castelo, A., Roque-Barreira, M.C. (2008) Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.* 173(2): 423–432.
57. Coltri, K.C., Casabona-Fortunato, A.S., Gennari-Cardoso, M.L., Pinzan, C.F., Ruas, L.P., Mariano, V.S., Martinez, R., Rosa, J.C., Panunto-Castelo, A., Roque-Barreira, M.C. (2006) Paracoccin, a glcnac-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. *Microb. and Infect.* 8: 704-713.
58. Corradin, S.B., Buchmuller-Rouiller, Y., Mauel, J. (1991) Phagocytosis enhances murine macrophage activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* 21:2553–2558.
59. Correia, J.S., Ulevitch, R.J. MD-2 and TLR4 N-Linked Glycosylations Are Important for a Functional Lipopolysaccharide Receptor. *J. Biol. Chem.* 277:1845-1854.
60. Cyktor, J.C., Turner, J. (2011) Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect. Immun.* 79(8): 2964–2973.
61. De Camargo, Z. (2008) Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopath.* 165: 208-302.

62. Deckert-Schluter, M., Bluethmann, H., Rang, A., Hof, H., Schluter, D. (1998) Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J. Immunol.* 160:3427–3436.
63. Del Negro, G.M., Pereira, C. (2000) Evaluation of tests for antibody response in the follow-up patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med Microbiol.* 49: 37–46.
64. Del Sero, G., Mencacci, A., Cenci, E., d'Ostiani, C.F., Montagnoli, C., Bacci, A., Mosci, P., Kopf, M., Romani, L. (1999) Antifungal type 1 responses are up-regulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect.* 1:1169–1180.
65. Denis, M. (1991) Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell. Immunol.* 132:150–157.
66. De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E. (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes. an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174: 1209–1220.
67. Diterich, I., Rauter, C., Kirschning, C.J., Hartung, T. (2003) *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression. *Infect. Immun.* 71: 3979–3985.
68. Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 9557-9560.
69. Dos Reis Almeida, F.B., Oliveira, L.L., Sousa, M.V., Barreira, M.C.R., Hanna, E.S. (2010) Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis*; purification through affinity with chitin and identification of *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Yeast.* 27(2): 67-76.
70. Fan, B., Liu, L.G., Deng, X.L., Lu, H.J., Hu, X.Y., Wang, X.Z. (2006) Preparation of chicken egg yolk antibody against candida albicans and effect of temperature on its titer. *Beij. xue xue bao.* 18;38(4): 428-431.
71. Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Röschmann, K., Jung, G., Wiesmüller, K.H., Ulmer, A.J. (2008) Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J. Leukoc. Biol.* 83(3):692-701.
72. Fava-Neto, C., Vegas, V.S., Sciannamea, I.M., Guarnieri, D.B. (1969) Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 11: 177-181.
73. Fernandes, V.C., Martins, E.M.N., Boeloni, J.N., Coitinho, J.B., Serakides, R., Goes, A.M. (2011) The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microb. and Infect.* 13:1062-1072.
74. Figueiredo, F., Alves, L.M., Silva, C.L. (2003) Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin. Exp. Immunol.* 93: 189-194.
75. Fortes, M.R.P., Miot, H.A., Kurokawa, C.S., Marques, M.E.A., Marques, S.A. (2011) Immunology of paracoccidioidomycosis. *An. Bras. Dermatol.* 86 (3): 516–525.
76. Franco, M.F., Mendes, R.P., Moscardi-Bacchi, M., Rezzallah-Wasso, M., Montenegro, M.R. (1989) Paracoccidioidomycosis. *Clin. Trop. Med. Commun. Dis.* 18-196.

77. Franco, M., Montenegro, M.R., Mendes, R.P., et al. (1987) Paracoccidioidomycosis: gamma interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the lpsd (endotoxin resistance) phenotype. *J. Exp. Med.* 164:1791–1796.
78. Ganiko, L., Puccia, R., Mariano, V.S., Sant’anna, O.S., Freymuller, E., Roque-Barreira, M.C., Travassos, L.R. (2007) Paracoccin, na *N*-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes and Infect.* 9: 695-703.
79. Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., Sher, A. (1993) Interleukin 12 is required for T-lymphocyte-independent induction of interferon- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6115–6119.
80. Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Hieny, S., James, S.L., Sher, A. (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxidemediated mechanism inhibited by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* 22:2501–2506.
81. Goes, T.S., Goes, V.S., Kalapothakis, E., Leite, M.F., Goes, A.M. (2005) Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. *Immunol. Lett.* 101:24–31.
82. Gonzalez, A., Gomez, B.L., Diez, S., Hernandez, O., Restrepo, A., Hamilton, A.J., Cano, L.E. (2005) Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins, *Infect. Immun.* 73 2486e2495.
83. Gonzalez, A., Sahaza, J.H., Ortiz, B.L., Restrepo, A., Cano, L.E. (2003) Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med. Mycol.* 41: 391-399.
84. Gonzalez, A., de Gregori, W., Velez, D., Restrepo, A., Cano, L.E. (2000) Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine.
85. Gooden, M.J.M., Wiersma, V.R., Samplonius, D.F., Gerssen, J., van Ginkel, R.J., Nijman, H.W., Hirashima, M., Eggleton, P., Helfrich, W., Bremer, E. (2013) Galectin-9 activates and expands human T-helper 1 cells. *PLoS One.* 8(5): e65616. doi:10.1371/journal.pone.0065616.
86. Gow, N.A.R., Gadd G. M. (1995) *The growing fungus*, Chapman & Hall, London.
87. Green, S.J., Nacy, C.A. (1982) Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokines- induced nitric oxide synthesis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 6: 384.
88. Grocott, R.G. (1955) A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am. J. Clin. Pathol.* 25(8): 975-979.
89. Gu, Z., Weidenhaupt, M., Ivanova, N., Pavlov, M., Xu, B. Zhi-Guo, S., Jan-Christer, J. (2002) Chromatographic Methods for the Isolation of, and Refolding of Proteins from, *Escherichia coli* Inclusion Bodies. *Prot. Exp. Purif.* 25, 174–179.
90. Hajjar, A.M., D.S. O'Mahony, A. Ozinsky, D.M. Underhill, A. Aderem, S.J. Klebanoff, and C.B. Wilson. (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* 166:15–19.

91. Haraguchi, N., Ishii, Y., Morishima, Y., Yoh, K., Matsuno, Y., Kikuchi, N., Sakamoto, T., Takahashi, S., Hizawa, N. (2010) Impairment of host defense against disseminated candidiasis in mice overexpressing GATA-3. *Infect Immun* 78: 2302–2311.
92. Harris S.D., Momany, M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal. Genet. Biol.* 41, 391-400.
93. Henneke, P., Morath, S., Uematsu, S., Weichert, S., Pfitzenmaier, M., Takeuchi, O., Müller, A., Poyart, C., Akira, S., Berner, R., Teti, G., Geyer, A., Hartung, T., Trieu-Cuot, P., Kasper, D.L., Golenbock, D.T. (2005) Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J. Immunol.* 174(10):6449-6455.
94. Higgins, S.C., Lavelle, E.C., McCann, C., Keogh, B., McNeela, E., Byrne, P., O’Gorman, B., Jarnicki, A., McGuirk, P., Mills, K.H. (2003) Toll-like receptor-4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J. Immunol.* 171: 3119–3127.
95. Hirschfeld, M., Weis, J.J., Toshchakov, V., Salkowski, C.A., Cody, M.J., Ward, D.C., Qureshi, N., Michalek, S.M., Vogel, S.N. (2001) Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 1477–1482.
96. Hoag, K.A., Lipscomb, M.F., Izzo, A.A., Street, N.E. (1997) IL-12 and IFN- γ are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. *Am. J. Cell Mol. Biol.* 17(6):733-739.
97. Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zähringer, U., Beutler, B. (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523–527.
98. Hormung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168(9):4531-7.
99. Horré, R., Schumacher, G., Alpers, K., Seitz, H.M., Adler, S., Lemmer, K., De Hoog, G.S., Schaal, K.P., Tintelno, K. (2002) A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. *Med. Mycol.* 40: 213–216.
100. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O’Garra, A., Murphy, K.M. (1993) Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260, 547–549.
101. Hughes, A.L., Piontkivska, H. (2008) Functional diversification of the Toll-like receptor gene family. *Immunogenetics* 60: 249-256.
102. Iabuki, K., Montenegro, M.R. (1979) Experimental paracoccidioidomycosis in the syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with the presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathol.* 67: 131-144.
103. Ito, J.I. (2011) T cell immunity and vaccines against invasive fungal diseases. *Immunol. Invest.* 40, 825–838.

104. Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Murakami, S., Sano, H., Konishi, M., Akino, T., Kuroki, Y. (2002). The extracellular Toll like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 277:24315–24320.
105. Janeway, C.A.Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. Annu Rev. Immunol. 20:197-216.
106. Jin, M.S., Lee, J.O. (2008) Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. Cell. DOI 10.1016/j.immuni.2008.07.007.
107. Jintaridth, P., Srisomsap, C., Vichittumaros, K., Kalpravidh, R.W., Winichagoon, P., Fucharoen, S., Jisnuson, Svasti, M.R., Kasinrer, W. (2006) Chicken egg yolk antibodies specific for the gamma chain of human hemoglobin for diagnosis of thalassemia. Int. J. Hematol. 83 (5): 408-414.
108. Juliarena, M., Gutierrez, S., Ceriani, C. (2007) Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture elisa to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. Vet. Res. Commun. 31(1): 43-51.
109. Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, M., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe, N., Nishimura, K., Miyaji, M. (2003) The trend of imported mycosis in Japan. J. Infect. Chemother. 9(1): 16-20.
113. Kashino, S.S., Fazioli, R.A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L.H., Vaz, C.A., Burger, E., Singer, L.M., Calich, V.L. (2000) Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of INF-gamma production. J. Interferon Cytokine Res. 20: 89-97.
114. Kaposzta, R., Tree, P., Marodi, L., Gordon, S. (1998) Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophage in host defense against *Candida albicans*. Japan. J Infect Chemother. 9:1 6-20.
115. Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., Takeshige, K. (2002) Activation of macrophages by linear (1 → 3)-β-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. J. Biol. Chem. 277:36825–36831.
116. Kawai, T., Akira, S. (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int. Immunol. 21(4):317-37. doi: 10.1093/intimm/dxp017.
117. Kawakami, K., Tohyama, M., Qifeng, X., and Saito, A. (1997) Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase mRNA in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*: Effects of interleukin-12. Infect. Immun. 45, 1307–1312.
118. Kawakami, K., Tohyama, M., Xie, Q., Saito, A. (1996) Interleukin-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. Clin. Exp. Immunol. 104, 208–214.
119. Kerr, I.B., Araripe, J.R., Oliveira, P.C., Lenzi, H.L. (1988) *Paracoccidioidomycosis*: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. Revista do Instituto de Medicina Tropical, São. Paulo, v.30, n.5, p.336-350.
120. Kindler, V., Sappino, A.P., Grau, G.E., Piguet, P.F., Vassalli, P. (1989) The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell. 56:731–740.
121. Ko, K.Y., Ahn, D.U. (2007) Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Poult Sci 86(2): 400–407.

122. Kobe, B., Deisenhofer, J. (1995) Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 409–416.
123. Koedel, U., Angel, B., Rupprecht, T., Wagner, H., Roggenkamp, A., Pfister, H.W., Kirschning, C.J. (2003) Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J. Immunol.* 170: 438–444.
124. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* 420:1-16.
125. Kurita, N., Biswas, S.K., Oarada, M., Sano, A., Nishimura, K., Miyaji, M. (1999) Fungistatic and fungicidal activity of murine polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 37: 19–24.
126. Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. (1992) Paracoccidioidomycosis. In: Kwon- Chung KJ, Bennet JE, editors. *Medical mycology*. Philadelphia Lea & 2546–2552.
127. Lacaz, C.S. (2002) Paracoccidioidomycose: In: Lacaz. C.S., Porto, E., Matins, J.E.C., Heins-Vaccari, E., Melo, N.T. *Tratado de micologia médica* Lacaz. São Paulo: Sarvier.
128. Lacaz, C.S. (1994) Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis
129. Leenen, P.J., Canono, B.P., Drevets, D.A., Voerman, J.S., Campbell, P.A. (1994) TNF-alpha and IFN-gamma stimulate a macrophage precursor cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide-independent manner. *J. Immunol.* 153:5141–5147.
130. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette Spaetzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86: 973–983.
131. Li, X.Y., Jin, L.J., Mcallister, T.A., Stanford, K., Xu, J.Y., Lu, Y.N., Zhen, Y.H., Sun, Y.X., Xu, Y.P. (2007) Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). *J Agric Food Chem* 55(8): 2911–2917.
132. Lien, E., Means, T.K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M.J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R.W., Ingalls, R.R., Golenbock, D.T. (2000) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 105:497–504.
133. Livonesi, M.C., Rossi, M.A., de Souto, J.T., Campanelli, A.P., de Sousa, R.L., Maffei, C.M., Ferreira, B.R., Martinez, R., da Silva, J.S. (2009) Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 11(1):123-132.
134. Loures, F.V., Pina, A., Felonato, M., Feriotti, C., Araújo, E.F., Calich, V.L.G. (2011) MyD88 Signaling Is Required for Efficient Innate and Adaptive Immune Responses to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Infect. Imm.* 2470–2480.
135. Magee, D.M., Cox, R.A. (1996) Interleukin-12 regulation of host defense against *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 64, 3609–3613.
136. Mamoni, R.L., Blotta, M.H. (2005) Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine.* 32:20-29.
137. Mariano, V.S. (2007) Paracoccina: detecção em leveduras, micélio e formas de transição de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre.

138. Marques, S.A. (2012) Paracoccidioidomycosis. *Clinics in Dermat.* 30, 610–615.
139. Marques, A.F., da Silva, M.B., Juliano, M.A.P., Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2006) Peptide Immunization as an Adjuvant to Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agentes and Chemoth.* 50(8): 2814–2819.
140. Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D.T., Wetzler, L.M. (2002) Cutting edge: immune stimulation by neisserial porins is Toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* 168:1533–1537.
141. Mayr, A., Kirchmair, M., Rainer, J., Rossi, R., Kreczy, A., Tintelnot, K., Dierich, M.P., Lass-Flörl, C. (2204) Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 916–919.
142. McEwen, J.G., Bedoya, V., Patiño, M.M., Salazar, M.E., Restrepo, A. (1987) Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25(3): 165-175.
143. McInturff, J.E., Modlin, R.L., Kim, L. (2005) The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J. Invest. Dermatol.* 125(1): 1-8.
144. Miyaji, M., Kamei, K. (2003) Imported mycoses: an update. *J. Infect. Chemother.* 9: 107–113.
145. Mizel, S.B., West, A.P., Hantgan, R.R. (2003) Identification of a sequence in human Toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J. Biol. Chem.* 278:23624–23629.
146. Mizushima, S., Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *11;18(17):5322.*
147. Morrison, C.J., Brummer, E., Isenberg, R.A., Stevens, D.A. (1987) Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity by recombinant gamma interferon. *J. Leukoc. Biol.* 41: 434–440.
148. Moscardi-Bacchi, M., Brummer, E., Stevens, D.A. (1994) Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J. Med. Microbiol.* 40:159–64.
149. Müller, U., Stenzel, W., Köhler, G., Werner, C., Polte, T., Hansen, G., Schütze, N., Straubinger, R.K., Blessing, M., McKenzie, A.N., Brombacher, F., Alber, G. (2007) IL-13 induces disease promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 179: 5367–5377.
150. Munk, M.E., Kajdacsy-Balla, A., Del Negro, G., Cuce, L.C., Da Silva, W.D. (1992) Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 30 (4): 317-321.
151. Nakaira-Takahagi, E., Golim, M.A., Bannwart, C.F., Pucci, R., Peraçoli, M.T. (2011) Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med. Mycol.* 49(7):694-703.
152. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M., Kawakami, K. (2006) Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infections pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47: 148–154 .
153. Nakamura, L.T., Wu-Hsieh, B.A., Howard, D.H. (1994) Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 62:680–684.

154. Nascimento, F.R., Calich, V.L., Rodríguez, D., Russo, M. (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J. Immunol.* 1; 168(9): 4593-4600.
155. Netea, M.G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschuieren, I., Van Der Meer, J.W., Kullberg, B.J. (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* 185: 1483–1489 .
156. Neworal, E.P., Altemani, A., Mamoni, R.L., Noronha, I.L., Blotta, M.H. (2003) Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 21:234-241.
157. Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., Puzo, G. (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol.* 166: 7477–7485.
158. Nishikaku, A.S., Fagnani, R., Molina, S., Albel, B.P., Cunha, C.S., Scavone1, R., Pizzo1, C.R.P., Camargo, Z.P., Burger, E. (2011) Immunolocalization of IFN-gamma in the lesions of resistant and susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63: 281–288.
159. Nowell, P. C. (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 462-466.
160. Onda, H., Komine, M., Murata, S., Ohtsuki, M. (2011) Letter: imported paracoccidioidomycosis in Japan. *Dermatol. Online J.* 17: 11.
161. Oosting, M., Ter Hofstede, H., Sturm, P., Adema, G.J., Kullberg, B.J., van der Meer, J.W., Netea, M.G., Joosten, L.A. (2011) TLR1/TLR2 heterodimers play an important role in the recognition of *Borrelia spirochetes*. *PLoS One.* 6(10):e25998. doi: 10.1371/journal.pone.0025998.
162. Pagliari, C., Fernandes, E.R., Guedes, F., Alves, C., Sotto, M.N. (2006) Role of mast cells as IL10 producing cells in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Mycopath.* 62:331-335.
163. Pagliari, C., Sotto, M.N. (2003) Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am. J. Dermatopathol.* 25:107-112.
164. Panunto-Castelo, A., Souza, M. A., Roque-Barreira, M. C., Silva, J. S. (2001) KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiol.* 1035-1042.
165. Parise-Fortes, M.R., Marques, S.A., Soares, A.M., Kurokawa, C.S., Marques, M.E., Peracoli, M.T. (2006) Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br. J. Dermatol.* 154:643-650.
166. Peraçoli, M.T., Kurokawa, C.S., Calvi, S.A., Mendes, R.P., Pereira, P.C., Marques, S.A., Soares, A.M. (2003) Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 5: 413–418.

167. Peraçoli, M.T., Fortes, M.R., Da Silva, M.F., Montenegro, M.R. (1995) Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 37:129-136.
168. Peumans, W. J., Van Damme, E. J. (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 347-352.
169. West, A., Koblansky, A.A., Ghosh, S. (2006) Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:409-437.
170. Phillips, K., Weinblatt, M. (2005) Granulomatous Lung Disease Occurring During Etanercept Treatment. *Arthr. Rheum.* 53(4), 618-620.
171. Pina, A., Valente-Ferreira, R.C., Molinari-Madlum, E.E., Vaz, C.A., Keller, A.C., Calich, V.L. (2004) Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect. Immun.* 72: 2369-2378.
172. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-88.
173. Prado, M., Silva, M.B., Laurenti, R., et al. (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:513-521.
174. Ramos-e-Silva, M., Saraiva, L.E. (2008) Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* 26: 257-269.
175. Reis e Sousa, C. (2004) Activation of dendritic cells: translating innate into adaptative immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 21-25.
176. Restrepo, A., McEwen, J.G., Castañeda, E. (2001) The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39(3):233-241.
177. Restrepo-Moreno, A. (1993) Paracoccidioidomycosis. In *Fungal Infectious and Immune Responses*, pp 251-276. Edited by J. W. Murphy. H. Friedman & M. Bendinelli. New York: Plenum Press.
178. Restrepo A. (1985) The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 23:323-334.
179. Restrepo, A., Velez, H. (1975) Effect of phagocytosis in vitro on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 13(1): 1-10.
180. Ribeiro, A.M., Bocca, A.L., Amaral, A.C., Faccioli, L.H., Galetti, F.C., Zárate-Bladés, C.R., Figueiredo, F., Silva, C.L., Felipe, M.S. (2009) DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Vaccine.* 27:606-613.
181. Rodrigues, G.S., Severo, C.B., Oliveira, F.M., et al. (2010) Association between paracoccidioidomycosis and cancer. *J Bras Pneumol.* 36(3):356-362.
182. Roeder, A., Kirschning, C.J., Rupec, R.A., Schaller, M., Weindl, G., Korting, HC. (2004) Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med. Mycol.* 42:485-498.
183. Romano, C.C., Mendes-Giannini, M.J., Duarte, A.J., Benard, G. (2002) IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine.* 18:149-57.
184. Ruas, L. P., Carvalho, F. C., Roque-Barreira, M.C. (2012) ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. *Front. Microbiol.* 15; 3: 218.

185. Ruas, L.P., Bernardes, E.S., Fermينو, M.L., de Oliveira, L.L., Hsu, D.K., Liu, F.T., Chammas, R., Roque-Barreira, M.C. (2009) Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2-biased immunity. *Plos One*. 4(2):e4519. doi: 10.1371/journal.pone.0004519.
186. Rudiger, H., Gabius, H.J. (2001) Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.* 589-613.
187. San-Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T. (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* 40: 225–242.
188. San-Blas, G., San-Blas, F. (1984) Molecular aspects of fungal dimorphism. *Crit. Rev. Microbiol.* 11(2):101-127.
189. Sarazin, F., Sainte-Marie, D., Demar, M., Aznar, C., Sarrouy, J., Pradinaud, R., Carme, B., Couppié, P. (2005) Cutaneous-mucosal paracoccidioidomycosis: the first case diagnosed in French Guiana. *Ann. Dermatol. Venereol.* 132: 136–139.
190. Schindler, U., Baichawal, V.R. (1994) Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.* 14(9):5820-5831.
191. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
192. Segal, B.H., Wang, X.Y., Dennis, C.G., Youn, R., Repasky, E.A., Manjili, M.H., Subjeck, J.R. (2006) Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discov. Today*. 11:534-540.
193. Sharma, S.K. (1986) Endotoxin detection and elimination in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8:5-22.
194. Sharon, N., Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiol.* 53R-62R.
195. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. (2012) Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep* 6: 23-34.
196. Singer-Verme, L.M., Ciavaglia, M.C., Kashino, S.S., Burger, E., Calich, V.L. (1992) The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 261–264.
197. Siqueira, K.Z., Campos Soares, A.M., Dias-Melicio, L.A., Calvi, S.A., Peraçoli, M.T. (2009) Interleukin-6 treatment enhances human monocyte permissiveness for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production. *Med. Mycol.* 47:259-267.
198. Soares, A.M., Calvi, S.A., Peraçoli, M.T., Fernandez, A.C., Dias, L.A., Dos Anjos, A.R. (2001) Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of
199. Souto, J.T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M.A., Silva, J.S. (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 156: 1811–1820.
200. Souza, M.A., Carvalho, F.C., Ruas, L.P., Ricci-Azevedo, R., Roque-Barreira, M.C. (2013) The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J* 30(7): 641–657.

201. Stillmark, H. (1988) Uber Ricin, ein giftigs ferment aus den samen von Ricinus comm. L., und einigen andersen Euphorbiaceen. Thesis Univ. Dorpat, quoted by Kocourek 1986.
202. Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A., Moore, K.J. (2005) Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COO-H-terminal cytoplasmic domains. *J. of Cell. Biol.* 170(3): 477-485.
203. Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936) Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 227-237.
204. Sweetser, M.T., Hoey, T., Sun, Y.L., Weaver, W.M., Price, G.A. and Wilson, C.B. (1998) The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 34775–34783
205. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169:10–14.
206. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13:933–940.
207. Teixeira, C. R., Cavassani, K. A., Gomes, R. B., Teixeira, M. J., Roque-Barreira, M. C., Cavada, B. S., Da Silva, J. S., Barral, A., Barral-Netto, M. (2006) Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine*, 3001-3008.
208. Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2012) Paracoccidioidomycosis vaccine. *Hum Vaccin. Immunother.* 8(10): 1450–1453.
209. Travassos, L.R., Rodrigues, E.G., Iwai, L.K., Taborda, C.P. (2008) Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopath.* 165:341-352.
210. Traynor, T.R., Huffnagle, G.B. (2001) Role of chemokines in fungal infections. *Med. Mycol.* 39, 41–50.
211. Ulhoa, C.J., Peberdy, J.F. (1992) Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb Technol* 14: 236–241.
212. Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811–815.
213. Van Damme, P.A., Bierenbroodspot, F., Telgt, D.S., Kwakman, J.M., De Wilde, P.C., Meis, J.F. (2006) A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. *Med. Mycol.* 44: 13–18.
214. Van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F.H.M., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G., Yazdanbakhsh, M. (2002) A novel host-parasite lipid cross-talk: schistosomal lyso-phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277: 48122–48129.
215. Vasselon, T., Detmers, P.A., Charron, D., Haziot, A. (2004) TLR2 recognizes a bacterial lipopeptide through direct binding. *J. Immunol.* 173:7401–7405.
216. Verli, F.D., Marinho, A.S., Souza, S.C., Figueiredo, M.A.S., Yurgel, L.S. (2005) Perfil clínico epidemiológico dos pacientes portadores de Paracoccidioidomicose no Serviço de estomatologia do

- Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38: 234-237.
217. Vicentini, A.P., Gesztesi, J.L., Franco, M.F., Souza, W., Moraes, J.Z., Travassos, L.R., Lopez, J.D. (1994) Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect. Immun. 62 1465e1469.
 218. Wanke, B., Aidê, M.A. (2009) Paracoccidioidomycosis. J. Bras. Pneumol. 35:1245-1249.
 219. Weber, A.N.R., Morse, M.A., Gay, N.J. (2004) Four N-linked Glycosylation Sites in Human Toll-like Receptor 2 Cooperate to Direct Efficient Biosynthesis and Secretion. J. Biol. Chem. 279:34589-34594.
 220. Wetzler, L.M. (2003) The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. Vaccine. 21(Suppl. 2):S55-60.
 221. Wooten, R.M., Morrison, T.B., Weis, J.H., Wright, S.D., Thieringer, R., Weis, J.J. (1998) The role of CD14 in signaling mediated by outer membrane lipoproteins of *Borrelia burgdorferi*. J. Immunol. 160:5485-5492.
 222. Xidieh, C.F., Lenzi, H.L., Calich, V.L.G., Burger, E. (1997) Histopathological differences between resistant and susceptible hosts in a isogenic murine model of paracoccidioidomycosis, in 13th congress of the internacional society for human and animal mycology p185 abstr p427.
 223. Yauch, L.E., Mansour, M.K., Shoham, S., Rottman, J.B., Levitz, S.M. (2004) 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. 72: 5373- 5382.
 224. Yabuki, M., Mizushima, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fuji, T., Shimada, M., Yamashida, M. (1986) Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophyla* susp. *anaerogenes* A52. Appl. Microbiol. 32: 25-32.
 225. Zdero, P., Sieve, M.C., Tewari, R.P., Seder, R.A. (1993) Interleukin-12 modulates the protective immune response to SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. Med. (B Aires) 53: 408-412.
 226. Zhang, Y., Wang, F., Tompkins, K.C., Mcnamara, A., Jain, A.V., Moore, B.B., Toews, G.B., Huffnagle, G.B., Olszewski, M.A. (2009) Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. Am. J. Pathol. 175: 2489-2500.
 227. Zhou, P., Sieve, M. C., Tewari, R. P., and Seder, R. A., Interleukin-12 modulates the protective immune response to SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 65, 936-942.

Anexo I

Recombinant Paracoccin Reproduces the Biological Properties of the Native Protein and Induces Protective Th1 Immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection.

Ana Claudia Paiva Alegre¹, Aline Ferreira Oliveira¹, Fausto Bruno Dos Reis Almeida¹, Maria Cristina Roque-Barreira¹, Ebert Seixas Hanna¹.

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

ABSTRACT

Background

Paracoccin is a dual-function protein of the yeast *Paracoccidioides brasiliensis* that has lectin properties and *N*-acetylglucosaminidase activities. Proteomic analysis of a paracoccin preparation from *P. brasiliensis* revealed that the sequence matched that of the hypothetical protein encoded by *PADG-3347* of isolate Pb-18, with a polypeptide sequence similar to the family 18 endochitinases. These endochitinases are multi-functional proteins, with distinct lectin and enzymatic domains.

Methodology/principal findings:

The multi-exon assembly and the largest exon of the predicted ORF (*PADG-3347*), was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells, and the features of the recombinant proteins were compared to those of the native paracoccin. The multi-exon protein was also used for protection assays in a mouse model of paracoccidioidomycosis.

Conclusions/Significance:

Our results showed that the recombinant protein reproduced the biological properties described for the native protein—including binding to laminin in a manner that is dependent on carbohydrate recognition—showed *N*-acetylglucosaminidase activity, and stimulated murine peritoneal macrophages to produce high levels of TNF- α and nitric oxide. Considering the immunomodulatory potential of glycan-binding proteins, we also investigated whether prophylactic administration of recombinant paracoccin affected the course of experimental paracoccidioidomycosis in mice. In comparison to animals injected with vehicle (controls), mice treated with recombinant paracoccin displayed lower pulmonary fungal burdens and reduced pulmonary granulomas. These protective effects were associated with augmented pulmonary levels of IL-12 and IFN- γ . We also observed that injection of paracoccin 3 days

before challenge was the most efficient administration protocol, as the induced Th1 immunity was balanced by high levels of pulmonary IL-10, which may prevent the tissue damage caused by exacerbated inflammation. The results indicated that paracoccin is the protein encoded by *PADG-3347*, and we propose that this gene and homologous proteins in other *P. brasiliensis* strains be called paracoccin. We also concluded that recombinant paracoccin confers resistance to murine *P. brasiliensis* infection by exerting immunomodulatory effects.

AUTHOR SUMMARY

Paracoccin is a constituent of *Paracoccidioides brasiliensis*, a human pathogen that causes paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Paracoccin is a dual function protein with domains for lectin and *N*-acetylglucosaminidase activities. Proteomic analysis of paracoccin preparation revealed its correspondence to a hypothetical protein from the *P. brasiliensis* isolate *Pb-18*, annotated as *PADG-3347*, which has a polypeptide sequence similar to family 18 endochitinases. These endochitinases are multi-functional proteins with distinct lectin and enzymatic activity domains. The multi-exon assembly of the correspondent gene (*PADG-3347*) was cloned and expressed in *E. coli*, and the physical and biological features of the recombinant protein was compared to those of the native paracoccin. Moreover, recombinant *PADG-3347* was evaluated for its immunomodulatory properties and its ability to confer protection against murine *P. brasiliensis* infection. The results presented herein showed that mice treated with recombinant paracoccin displayed lower pulmonary fungal burdens and reduced pulmonary granulomas. These protective effects were associated with augmented pulmonary levels of IL-12 and IFN- γ .

INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis [1, 2] is a thermo-dimorphic fungus that grows as a mycelium at 25 °C and as a yeast at 37 °C. *P. brasiliensis* infection in humans is known as paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic granulomatous disease with high prevalence in Latin America [3]. An estimated 10 million people are infected with *P. brasiliensis* most people do not show clinical evidence of PCM.

The infection is acquired by inhalation of airborne propagules [4]. Once in the lungs, the fungus is stimulated by body temperature, and then it activates a number of genes that transform the conidia into the pathogenic form [5, 6]. Such dimorphism is an important

feature of several pathogenic fungi, including *P. brasiliensis* [7]. The cell wall is involved in the morphogenetic changes that occur during this transition, and it plays key roles in the pathobiology of PCM [8].

Cell-mediated immunity is the main mechanism of defense against PCM [9], whereas a high humoral response correlates with disease dissemination [10]. Therefore, resistance to PCM is linked to high IFN- γ production by T helper type 1 (Th1) lymphocytes, and PCM susceptibility is associated with the lack of a cellular response and B cell activation [11, 12]. Early secretion of IL-12, followed by sustained secretion of IFN- γ , are important for resistance against *P. brasiliensis* infection [13]. The most physiologically important IL-12 target cells are T lymphocytes, which proliferate and differentiate into cells that produce type-1 cytokines, particularly IFN- γ [14].

We previously demonstrated that extracts of *P. brasiliensis* yeast contain an *N*-acetylglucosamine-binding lectin called paracoccin [15]. This protein binds to laminin in a sugar recognition-dependent manner, induces macrophages to produce TNF- α and NO, and is related to fungal growth [16] and morphogenesis [17]. In addition, paracoccin exerts *N*-acetylglucosaminidase activity [18]. Proteomic studies have showed that a paracoccin preparation requires a multi-domain protein, annotated as PADG-3347 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960922883) that shares sequence similarity with the dual function proteins of chitinase family 18, and has an additional domain that contains the *N*-acetylglucosamine-binding activity [19]. These features explain the influence of paracoccin on fungal cell growth and morphogenesis, and its ability to interact with the host extracellular matrix and immune cells [20]. In this study, we cloned and expressed the putative recombinant paracoccin to compare the features of the recombinant protein to those of native paracoccin and to investigate the effect of administering the recombinant protein on an experimental model of PCM.

MATERIALS and METHODS

Ethics Statement

The study was approved by the Ethical Committee for Ethics in Animal Research (CETEA) of the School of Medicine at Ribeirão Preto of the University of São Paulo. All animal experiments and were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal

Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) (Protocol 20/2013-1).

***P. brasiliensis* strain and accession number**

The *P. brasiliensis* isolate used in this study, Pb18, was kindly provided by Dr. Roberto Martinez (Faculty of Medicine in Ribeirão Preto, University of São Paulo). Yeast cells were cultivated on Fava-Netto semisolid medium, YPD agar, and BHI broth. Virulence was maintained by consecutive intravenous infections in mice. The yeast were recovered from mouse lung tissue and then cultured on Fava-Netto medium at 37 °C for 7 days. The viability of the yeast cells was determined by fluorescein diacetate and ethidium bromide staining [21], and it was always greater than 90%.

The nucleotide sequence of *PADG-3347*, hereafter called paracoccin, was assigned in the Broad Institute website as “*PADG_03347.1* conserved hypothetical protein (Transcript:*PADG_03347T0*)” (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/TranscriptDetails.html?component=%24DirectLink&service=direct&session=T&sp=S7000001960922884&sq=transcriptId%2C%2CS7000001960922884&sqpage=release%2FTranscriptDetail).

Cloning of paracoccin

The gene encoding paracoccin is composed of five exons and four introns. Therefore, paracoccin was cloned in two different ways. First, the largest exon was amplified from *P. brasiliensis* genomic DNA using the oligonucleotide primers *F_{PADG}* (5'-CTGGATCCATGCAAGCACCCGACCAAC-3') and *R_{PADG}* (5'-CGGGAATTCCTACCAACTCGTTATTGATAGAGCGATAA-3'), and then cloned into pGEX-4T-1 (GE Healthcare, Upsala, Sweden) flanked by *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites. Second, the full-length, predicted ORF encoding paracoccin was synthesized, and cloned into the pUC57 vector (GenScript, Piscataway, NJ, USA). In the first strategy, the paracoccin fragment, referred to as rPCN_{exon4}, is fused to a GST tag in the pGEX vector, whereas in the second strategy, the 5'-UTR region, which drives transcription of paracoccin (rPCN_{full}) was also synthesized. Competent *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the recombinant vectors, and clones resistant to ampicillin were screened for the presence of the inserts by PCR. Positive clones were also submitted for DNA sequencing (ABI 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The two cloning strategies for the construction of the

expression vectors are shown in figure 1. All clonings were performed using standardized methods [22].

Protein expression and purification

rPCN_{exon4}

E. coli BL21 (DE3) colonies transformed with pGEX-padg3347/*exon4*, were cultivated in 5.0 mL of LB medium with ampicillin (100 µg/mL). The culture was incubated overnight at 37 °C with shaking (180 rpm). This pre-inoculum was diluted 1:100 in 500 mL of the same medium, and incubated at 37 °C with shaking (180 rpm) until the OD₆₀₀ = 0.6. Then, IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM. The culture was induced overnight at 21 °C with shaking (80 rpm). Subsequently, the culture was centrifuged at 3,000 × g for 20 min at 4 °C, and then the bacterial pellet was resuspended in cold buffer A (Tris-HCl pH 7.5, 100 mM, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.2 mM sodium azide, and protease inhibitor), homogenized in Ovnix Mixer 2000 at maximum speed for 4 pulses of 15 s at 60-second intervals on ice. The bacterial suspension was sonicated (5 pulses for 10 s each at 60-second intervals). Triton X-100 was added to a final concentration of 1%, and the lysed cells were centrifuged at 3,000 × g for 30 min. The supernatant was collected and subjected to affinity chromatography on a glutathione-Sepharose 4B column equilibrated with buffer A and incubated with slow rotation for 1 h. Washings were performed with buffer B (buffer A plus 250 mM NaCl and 0.25% Tween-20), until the flow through had an OD₂₈₀ of less than 0.002. The bound protein was eluted with buffer C (buffer A containing 10 mM reduced glutathione) and dialyzed against distilled water in an Amicon system (Amicon Division, W. R. Grace & Co., Beverly, MA, USA), using dialysis disks with nominal molecular weight limit (NMWL) of 10 kDa (Millipore Co., Billerica, MA, USA). The purified protein was quantified by using the method of Bradford [23].

rPCN_{full}

E. coli BL21 (DE3) cells were transformed with pUC57-padg3347/fullORF, and plated on selective medium containing ampicillin. Recombinant strains were grown at 37 °C with shaking until the OD₆₀₀ reached 0.6. Recombinant protein expression was induced by the addition of IPTG at a final concentration of 0.5 mM. The cells were cultivated for an additional 5 h, and then harvested by centrifugation. The pellet was resuspended in lysis buffer (5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) and the

cells were disrupted by sonication. Triton X-100 was added to a final concentration of 1%, and the suspension was centrifuged at $3,000 \times g$ for 30 min. The homogenate, containing soluble and insoluble proteins, was diluted in 20 mL of urea buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, and 200 mM sodium chloride) and incubated overnight with agitation at room temperature. The homogenate was dialyzed against refolding buffer that contained 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.2 mM PMSF, and various concentrations of urea to refold the protein. For refolding, the dialysis buffer was removed and replaced every 24 h, and with each replacement, the concentration of urea was reduced until the final dialysis contained no urea. After refolding, the protein was purified by affinity chromatography on an *N*-acetylglucosamine column, and the LPS was removed using an immobilized polymyxin B agarose column (BioRad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

***N*-acetylglucosaminidase activity assay**

The *N*-acetylglucosaminidase (NAGase) activity of the recombinant paracoccin was evaluated using 100 μ L of p-nitro-phenol-*N*-acetyl-glucosaminidase (pNP-GlcNAc, 5 mM; Sigma), 350 μ L of sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0), and 50 μ L of each sample. To stop the reaction, 1 mL of 0.5 M sodium carbonate was added to the reaction tube, and then the absorbance was measured at 405 nm. The reaction conditions were the same as those used by Yabuki [24] and adapted by Ulhoa and Peberdy [25]. A unit of NAGase activity was defined as the amount of enzyme required to convert 1.0 mmol of *p*-nitrophenol per minute at 37 °C. The specific activity was determined as the number of enzyme units per mg of total protein.

Biotinylation of recombinant paracoccin

For biotinylation, 2.0 mg of recombinant paracoccin was incubated with 20 μ L of a 1% aqueous solution of Ez-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) for 2 h at 4 °C in the dark. The biotinylated proteins were dialyzed against PBS, using a centrifugal filter device NMWL of 30 kDa (Millipore Co.), to completely remove the remaining biotin.

Binding to laminin

Each well of a 96-well microplate (Maxi Sorp Fluoro Nunc, Roskilde, Denmark) was coated with 250 ng of laminin derived from mouse Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma (EHS)

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in carbonate buffer (pH 9.6) and incubated overnight at 4 °C. Different concentrations of biotinylated protein were added to each well, and then the plate was incubated at room temperature (RT) for 120 min. The plate was then further incubated with neutravidin-peroxidase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) for 90 min at RT. The binding of the biotinylated protein to laminin was detected by adding *O*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), and reaction was then stopped by the addition of 2N sulfuric acid. Readings were made at $\lambda = 490$ nm (PowerWave X, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). For the inhibition assays, biotinylated protein was pre-incubated with 100 mM *N*-acetylglucosamine, D-glucose, or D-galactose for 1 h at RT. Data shown are representative of three separate assays (reported in relative luminescence units, RLU).

Production of TNF- α and NO

C57BL/6 mice were injected with 1.0 mL of sterile 3% sodium thioglycollate (Sigma-Aldrich). After 3 days, the animals were killed, and their cells were recovered by washing the peritoneal cavity with 5.0 mL of sterile PBS. The cells were immediately stored on ice and washed with RPMI 1640 medium (Flow Laboratories, Inc., McLean, VA, USA) containing 5% inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL), and placed in 24-well culture plates (10^6 cells/well). After incubation at 37 °C 2 h, non-adherent cells were removed, and adherent cells were incubated in 5% RPMI medium containing rPCN_{full} or rPCN_{exon4} (250 ng/mL). TNF α and NO levels in the supernatants were measured by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and by nitrate accumulation, respectively, as previously described [15].

Production of IgY antibodies

The procedure for immunizing chickens was performed according to Akita and Nakai [26], with slight modifications. Briefly, immunizations was performed by injecting (intramuscularly) 80 μ g of native (PCN_{prep}) or recombinant (rPCN_{full}) paracoccin emulsified in Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich). In weeks 2, 4, and 6 post-inoculation, booster immunizations were administered with antigens emulsified in Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich). The eggs were collected and kept at 4 °C. Eggs were also collected during the pre-immunization period to obtain antibodies used as control IgY (IgY irrelevant). The content of the yolk was diluted in ultra-pure water (1:10), and after 6 h of gentle agitation at 4 °C, high density lipids were precipitated by centrifugation ($10,000 \times g$ for 25 min at 4 °C) to

collect the supernatant, which was rich in IgY. The IgY antibodies were purified by precipitation with 40% ammonium sulfate as previously described [27, 28]. The soluble fraction was collected and incubated at 4 °C under constant agitation during the addition of ammonium sulfate. Then, the solution was centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and the first supernatant was discarded. The pellet was resuspended in PBS and 40% ammonium sulfate precipitation was repeated twice as described above. The last pellet was resuspended in PBS-azide and dialyzed against PBS using a membrane with NMWL of 10 kDa (Amicon Division, W.R. Grace Co.) to remove the ammonium sulfate.

Confocal microscopy

The yeast cells were cultivated for 3 days at 37 °C with shaking. The cells (10^6 viable cells/mL) were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 15 min, centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min, and resuspended again in 3.7% paraformaldehyde. After centrifugation, the cells were resuspended in PBS buffer with 0.05% Tween and 1% BSA (PBS-TB), containing the IgY polyclonal antibodies against anti-rPCN_{full} or anti-PCN_{prep} for 1 h at RT. Cells were then washed three times with PBS, and incubated for 1 h at RT with neutravidin AlexaFluor_488-conjugate (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in PBS-TB for 1 h at RT in the dark. After 40 min, 10 µg/mL of calcofluor (Sigma-Aldrich) was added for the remaining 20 min of incubation. After washing with PBS, coverslips were placed onto the glass slides with Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and fluorescence was analyzed using a fluorescence microscope. The slices were analyzed using a laser scanning confocal microscope (LSM-510 NLO; Carl Zeiss, Jena, Germany) using 40× NA 1.3 and 63× NA 1.4 plan apochromatic objectives. For phase-contrast microscopy studies, the samples were observed with an immunofluorescence microscope (DMI 4000B; Leica, Culver City, CA, USA). Z-series were processed with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Protection assay with recombinant paracoccin

Animals

The efficacy of protection with rPCN_{full} was assessed in four groups of five 6–8-week-old male BALB/c mice. They were bred and maintained under standard animal housing conditions in the animal house at the Ribeirao Preto School of Medicine, Sao Paulo University, Ribeirao Preto, SP, Brazil. All assays were performed in triplicate.

rPCN_{full} therapy and experimental infection

Each animal was injected subcutaneously (s.c.) with 0.5 µg of rPCN_{full} in 100 µL of sterile PBS. The treatment varied in terms of the number of rPCN_{full} injections (1–3), and the time intervals between injections (Table 1). The control animals were injected with vehicle only (PBS). The animals were then challenged by intravenous (i.v.) injection with 100 µL of a suspension containing 10⁶ *P. brasiliensis* yeast cells. The infection was evaluated on day 30 after challenge.

CFU counting

Mice were killed by cervical dislocation on day 30 post-infection, and fungal burden in the lung was examined as previously described [29]. One lung per animal was aseptically removed, weighed, and the tissue was disrupted in 1.0 mL of sterile PBS using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25 Basic; IKA Works, Inc., Wilmington, DE, USA). The number of viable cells was determined by plating crude and serially diluted homogenates onto brain heart infusion agar (BHI; HiMedia, Mumbai, Índia) supplemented with 4% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Life Technologies, Camarillo, CA, USA) and with 96 µg/mL gentamicin (Gibco BRL). Plates were incubated at 35 °C for 7–14 days. The number of *P. brasiliensis* colonies per gram of organ is reported as the mean and standard deviation (SD) of triplicate samples. Lung homogenate supernatants were also separated from the cell debris by centrifugation at 2,000 × *g* for 15 min, and stored at –20 °C for ELISA-based cytokine and nitric oxide (NO) quantification.

Histopathology

The lungs, obtained on day 30 post infection, were fixed in 10% formaldehyde for 24 h and embedded in paraffin. Tissue sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Gomori's methenamine silver stain and examined by light microscopy with an Axiophot photomicroscope (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany), coupled with a JVC TK-1270 camera (Victor Company of Japan Ltd., Tokyo, Japan).

Cytokine ELISAs

To determine the levels of IL-12p40, IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, IL-4, and IL-10 in the supernatants of the lung homogenates, the levels of these cytokines were measured by capture

ELISA with antibody pairs purchased from Pharmingen (San Diego, CA, USA). The cytokines were measured according to the manufacturer's protocol. The concentration of each cytokine was determined with reference to a standard curve generated by serial two-fold dilutions of recombinant murine cytokines.

NO production in the lungs

The concentration of NO₂ was quantified by using the standard Griess reaction [30], 1982), by incubating 50 µL of supernatant from the lung homogenates with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, and 2.5% H₃PO₄), at RT for 10 min. NO₂ was quantified by measuring the absorbance at 550 nm (Power Wave-X). Results are expressed as µM NO₂ and the values were compared to a standard curve generated using known concentrations of NaNO₂.

Statistical analysis of results

Statistical analyses of the differences between the means of experimental groups were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Differences with *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. All experiments were performed three different times, with a total of 5 animals in each group.

RESULTS

Refolding and purification of the recombinant proteins

The predicted mRNA transcript sequence of the PADG_03347 gene was used to design the oligonucleotides for the cloning procedures. Recombinant *E. coli* strains were evaluated according to the expression of the largest exon of the paracoccin gene (rPCN_{exon4}) and according to its predicted multiple exon assembly (rPCN_{full}). After inducing the cells containing rPCN_{exon4} (Fig. 2A), the harvested bacterial cells were prepared and the resulting lysate was subjected to affinity chromatography on a column of glutathione-sepharose 4B. The bound protein was eluted with reduced glutathione, and was analyzed by SDS-PAGE, which showed a single, 48-kDa band. The predicted sizes of rPCN_{exon4} and the GST fusion tag are 22 kDa and 26 kDa, respectively. The band containing rPCN_{exon4} was recognized by anti-GST and anti-native paracoccin antibodies (Fig. 2B). In contrast, the induction procedure for rPCN_{full} generated highly enriched inclusion bodies, which were solubilized with urea and refolded. The refolded material was applied to a GlcNAc affinity column and, after elution

with a specific sugar, the bound protein was analyzed by SDS-PAGE, which showed a single 28-kDa band (Fig. 2C) corresponding to rPCN_{full}. The purified rPCN_{full} was also analyzed by western blotting. The 28-kDa band was recognized by anti-native paracoccin IgY (Fig. 2D). These results indicate that there is immunological identity between the native and recombinant forms of paracoccin, and that the GlcNAc-binding property was preserved after the refolding and purification processes.

rPCN_{exon4} and rPCN_{full} reproduce the biological properties of native paracoccin

We previously reported that native paracoccin (PCN_{prep}) induces the production of TNF- α and nitric oxide by murine macrophages and interacts with laminin in a sugar recognition-dependent manner [15]. PCN_{prep} also has *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity, which probably accounts for the function of paracoccin during fungal growth and morphogenesis [18]. Comparison of the predicted polypeptide sequence of PADG_03347 with a database of functional domains using a Hidden Markov Model (HMM), HHPred, indicated that the enzymatic and lectin activities could be contained in its largest *exon* (*exon* 4). As shown in Fig. 3, rPCN_{exon4}, rPCN_{full}, and PCN_{prep} can induce murine peritoneal macrophages to produce TNF- α (Fig. 3, panel A) and nitric oxide (Fig. 3, panel B) at levels close to that of the positive control (LPS+IFN- γ). The NAGase activity of PCN_{prep}, rPCN_{exon4}, and rPCN_{full} was also evaluated (Fig. 3, panel C). The rPCN_{full} preparation showed an enzymatic activity of 0.054 U/mL and a specific activity of 2.65 U/mg. PCN_{prep} showed an 0.041 U/mL enzymatic activity and a specific activity of 2.05 U/mg. In contrast, the rPCN_{exon4} preparation had only residual NAGase activity, which was four times lower than that of PCN_{prep} (Panel C).

We also assessed the ability of both rPCNs (at concentrations of 25–200 ng/well) to bind laminin. Our results show that rPCNs were able to bind laminin in a dose-dependent manner (Fig. 3, panel D). Moreover, this interaction was selectively inhibited by the presence of *N*-acetylglucosamine (Fig. 3, panel E), as was previously reported for PCN_{prep} [15].

These results have given us some clues about the structure and function of paracoccin, and showed that the lectin domain is preserved in both recombinant proteins. However, rPCN_{exon4} did not have enzymatic activity. This impairment of the enzymatic activity of rPCN_{exon4} led us to further characterize only rPCN_{full}.

Detection of paracoccin in yeast cells using IgY against the recombinant protein

To verify whether IgY anti-rPCN_{full} was able to recognize PCN_{prep} in its natural context, we performed an immunofluorescence assay with non-permeabilized *P. brasiliensis* yeast cells. As shown in figure 4, fluorescence labeling was mostly detected on the cell surface, particularly on daughter cells. A pseudohyphal form, seen in the preparation, was prominently labeled at its tip. This labeling was verified both in the yeast and hyphal forms of *P. brasiliensis* (data not shown), and reproduces previous results obtained with murine IgG raised against PCN_{prep}.

Effect of rPCN_{full} administration on pulmonary fungal load and histopathology

We evaluated whether prophylactic administration of rPCN_{full} affected the course of PCM using a murine model. To determine the most effective administration regimen, groups of BALB/c mice were administered a variable number of injections spaced at different time intervals (see Table 1, Materials and Methods), and then challenged i.v. with *P. brasiliensis* yeast. Thirty days after infection, pulmonary fungal burden lowered by approximately 80% in all rPCN_{full}-treated groups compared to the untreated control group (Fig. 5B). Light microscopy examination of lung sections from all rPCN_{full}-treated mice, regardless of the administration regimen, showed that the organ architecture was mostly preserved, with scant compact and well-organized granulomas and a few silver-stained yeasts (Fig. 5A). In contrast, coalescent granulomas were frequently observed in the lung sections of mice in the control group. Notably, a large amount of yeast were observed both inside and outside the granulomas. Morphometric analysis revealed significantly ($p < 0.05$) lower granuloma density in the lungs of mice from group 3 (0.92 granulomas/mm²) and 4 (0.94 granulomas/mm²), which were injected with rPCN_{full} on day 10 and day 3 before infection, respectively, compared to the other treated groups (Fig. 5C). These results suggest that administration of rPCN_{full} could diminish the pulmonary damage in *P. brasiliensis* yeast-challenged mice.

Pulmonary levels of cytokines and NO in challenged mice

To determine if the advantageous effect of rPCN_{full} administration was associated with induction of a protective immune response to fungal infection, the levels of cytokines and nitric oxide in lung homogenates were measured on day 30 after the challenge. The levels of IL-12p40 were three times higher in groups 3 and 4 than in the control group (Fig. 6A). Consistently, the levels of IL-12p70 were four and three times higher in groups 3 and 4, respectively (Fig. 6B). The production of TNF- α (Fig. 6C) and IFN- γ (Fig. 6D) was five and

two times higher in mice of group 3, respectively, and approximately two and three times higher in group 4, respectively, than that of the control group. Therefore, mice that received rPCN_{full} following the protocols for groups 3 and 4, presented significantly higher levels of Th1 cytokines than the control mice. This inflammatory profile was strengthened by the detection of higher levels of pulmonary NO in animals that received rPCN_{full} as prophylactic therapy (Fig. 6G).

Regarding Th2 cytokines, IL-4 pulmonary levels in the treated and control groups of mice were not significantly different (Fig. 6E). In contrast, IL-10 levels were significantly higher in groups 2 and 3 (Fig. 6F). These results indicate that prophylactic administration of rPCN_{full} may confer protection against *P. brasiliensis* infection through induction of T-helper 1 immunity in the host. rPCN_{full} injection three days before the challenge appears to be the most favorable administration protocol, since the Th1 response might be balanced by high levels of pulmonary IL-10, which may prevent tissue damage caused by inflammation.

DISCUSSION

We demonstrated that the recombinant form of paracoccin (rPCN_{full}) reproduced the biological activities of the native protein (PCN_{prep}) and conferred remarkable protection against fungal infection, probably due to skewed Th1 immunomodulation.

Native paracoccin, referred to as PCN_{prep}, was originally reported as a constituent of the GlcNAc-binding preparation (GNBP), an enriched extract of *P. brasiliensis* yeast, was shown to bind laminin [15], exert NAGase activity [18], and induce macrophages to produce TNF-alpha and nitric oxide [15, 18]. These activities were putatively attributed to a major 70-kDa protein in the GNBP fraction. This assumption is now tested frequently by newer proteomic and molecular studies. The lectin containing feature and enzymatic activities of PCN_{prep} could be attributed to the 28-kDa conserved hypothetical protein of *P. brasiliensis*, a double domain lectin/chitinase, whose gene is annotated in the Broad Institute website as PADG_03347.1.

Two products of the PADG_03347.1 gene, the proteins encoded by the largest exon (rPCN_{exon4}) and by the multi-exon assembly (rPCN_{full}), were both able to bind laminin and induce the production of inflammatory mediators by macrophages. However, the NAGase activity exerted by PCN_{prep} and rPCN_{full} was not reproduced by rPCN_{exon4}. This enzymatic activity plays important roles in the biology of the fungus [17]. However, it remains to be determined if this enzymatic activity is also relevant to the fungal interaction with host

immune cells. For this reason, rPCN_{full} was used in the subsequent *in vivo* experiments because it more accurately corresponded to the native protein.

Motivated by previous studies showing that paracoccin has interesting effects on immune cells [15], and that lectins are potential immunomodulatory agents [31, 32], we investigated the effect of recombinant paracoccin (rPCN_{full}) administration on the course of murine PCM. The protocols were designed based on prophylactic administration of the plant lectin ArtinM in mice, which succeeded in conferring resistance to murine leishmaniasis [33] and PCM [34]. In our study, rPCN_{full} was administered to groups of mice at various schedules and time intervals. We found that prophylactic administration of rPCN_{full} conferred protection against PCM, and was associated with the development of Th1-immunity and a clear reduction of the disease severity. All the rPCN_{full} administration protocols led to significantly lower frequencies of pulmonary granulomas and decreased fungal burdens. The control mice, which received only vehicle, had high fungal loads and extensive granulomatous lesions that disseminated to the liver and spleen. The pattern of disease in mice treated with rPCN_{full} was very similar to that exhibited by mice treated with ArtinM [34] or P10 vaccine [35]. This pattern was also similar to the mild form of human PCM, which is easily cured by anti-fungal therapy [36, 37].

Mild forms of human PCM are consistently demonstrated to be associated with Th1-biased immunity, a response that is considered essential for conferring resistance in animal models of fungal diseases [13, 38-40]. In a different way, Th2 immunity is associated with severe and disseminated forms of fungal diseases. These features are well established not only for the experimental models of paracoccidioidomycosis [13, 41], but also for cryptococcosis [42], and candidiasis [38, 43]. By comparing the cytokine concentrations in lung homogenates from the control and rPCN_{full}-treated mice, we could demonstrate that, among the groups that were treated with rPCN_{full}, the mice that received a single injection on day 10 or day 3 before the challenge had the highest levels of Th1 cytokines and higher NO levels. Surprisingly, no exacerbated inflammatory lesions were observed in any of the rPCN_{full}-treated animals, a fact that can be justified by the high levels of IL-10 in their lungs. The cytokine levels allow us to hypothesize that rPCN_{full} interacts with glycosylated receptors on the surface of immune cells and triggers the release of IL-12, as was demonstrated in mice treated with ArtinM, because it is well known that IL-12 stimulates NK and TCD4 cells to produce high levels of IFN- γ , which, in turn, induces high levels of NO and other proinflammatory mediators. They improve the fungicidal activity of macrophages [12], which is essential to confer resistance to

P. brasiliensis infection. It was previously demonstrated that *in vivo* depletion of IFN- γ leads to exacerbation of lung infection and systemic dissemination of fungal cells [44]. In contrast, TNF- α increases the permeability of the vascular endothelium, macrophage accumulation in the infected tissues, the development of epithelioid granulomas and restriction of fungal spreading [45-47]. Granuloma formation as well as the local immune response played by phagocytic cells and sustained granulomatous inflammation depend on TNF- α synthesis and are necessary to restrict fungal growth and dissemination [48, 49]. Increased pulmonary levels of IL-10 were detected in animals that received rPCN_{full} on days 10 and 3 before challenge, and in animals that received rPCN_{full} only on day 10 before challenge. Although IL-10 is considered a major mediator that facilitates the infection [50], it is also able to prevent inflammatory injuries due to exacerbated Th1 immunity [51]. This mechanism also seems to be the case for the *P. brasiliensis*-infected mice, following inoculation with rPCN_{full}, reported herein, or with ArtinM, as reported by Coltri [52].

Finally, our results support the relevance of the fungal protein paracoccin for the fate of experimental PCM. Prophylactic administration of a recombinant form of paracoccin resulted in a drastic reduction of pulmonary lesions and fungal burden compared to control mice. Our findings bring new insights into modulation of the immune response during *P. brasiliensis* infection with recognizable implications in the clinical investigation of PCM.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Luciana Pereira Ruas for helpful intellectual discussions, and Mrs Sandra M. O. Thomaz, Patricia E. Vendrusco and Vani M. A. Correa for excellent technical assistance. The histological morphometric analysis was performed in the Laboratory of Applied and Experimental Neurology of the Medical School of Ribeirao Preto, USP.

REFERENCES

1. Splendore A (1912) Zimonematosi con localizzazione nella cavita della bocca osservata nel Brasile. Bulletin de la Société de pathologie exotique (in French) (Paris) 5: 313–319.
2. Almeida FP (1930) Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. An. Fac. Med. Univ. São Paulo, 5: 125–141.

3. Ramos-e-Silva M, Saraiva LE (2008) Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* 26: 257–269.
4. McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A (1995) In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 26: 305–306.
5. San-Blas G, San-Blas F (1984) Molecular aspects of fungal dimorphism. *Crit Rev Microbiol* 11(2): 101–127.
6. McEwen JC, Brummer SDA, Restrepo A (1987) Effect of messine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 36(3): 603–608.
7. San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40: 225–242.
8. Castro ND, Castro KP, Orlandi V, Feitosa LS, Rosa E Silva LK et al. (2009) Characterization and functional analysis of the β -1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 9: 103–114.
9. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6: 89–117.
10. Arango M, Oropeza F, Anderson O, Contreras C, Bianco N, et al. (1982) Circulating immune complexes and *in vitro* cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 79: 153–158.
11. Calich VL, Vaz CAC, Burguer E (1998) Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* 149: 407–417.
12. Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, et al. (2008) Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 165: 223–236.
13. Calich VL, Kashino SS (1998) Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 31: 615–623.
14. Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133–146.
15. Coltri KC, Casabona-Fortunato AS, Gennari-Cardoso ML, Pinzan CF, Ruas LP, et al. (2006) Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. *Microbes Infect* 8 (3): 704–713.

16. Ganiko L, Puccia R, Mariano VS, Sant'Anna OA, Freymuller E, et al. (2007) Paracoccin, an N-acetylglucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes Infect* 9: 695–703.
17. Dos Reis Almeida FB, Carvalho FC, Mariano VS, Alegre ACP, Silva R do N, et al. (2011) Influence of N-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *PLoS One*. 6(12): ee29216. doi: 10.1371/journal.pone.0029216.
18. Dos Reis Almeida FB, Oliveira LL, Sousa MV, Roque Barreira MC, Hanna ES (2010) Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis* purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. *Yeast*. 27: 67–76, DOI: 10.1002.
19. Terwisscha van Scheltinga AC, Hennig M, Dijkstra BW (1996) The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol* 20;262(2):243-257.
20. Kunz C, Sellam O, Bertheau Y (1992) Purification and characterization of a chitinase from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. *Physiol Mol Plant Pathol* 40: 117–131.
21. Calich VL, Purchio A, Paula CR (1979) A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia* 28: 66(3): 175–177.
22. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344p.
23. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
24. Yabuki M, Mizushima K, Amatatsu T, Ando A, Fuji T, et al. (1986) Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophyla* susp. *anaerogenes* A52. *Appl. Microbiol.* 32: 25–32, 1986.
25. Ulhoa CJ, Peberdy JF (1992) Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb Technol* 14: 236–241.
26. Akita EM, Nakai S (1992) Immunoglobulins from eggs yolks: isolation and purification. *Food Sci* 57: 629–634.

27. Ko KY, Ahn DU (2007) Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. *Poult Sci* 86(2): 400–407.
28. Li XY, Jin LJ, Mcallister TA, Stanford K, Xu JY, et al. (2007) Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). *J Agric Food Chem* 55(8): 2911–2917.
29. Singer-Verme LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burger E, Calich VL (1992) The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 30: 261–264.
30. Green SJ, Nacy CA (1982) Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Curr Opin Infect Dis* 6: 384, 1982.
31. Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque Barreira MC (2013) The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J* 30(7): 641–657.
32. Gooden MJM, Wiersma VR, Samplonius DF, Gerssen J, van Ginkel RJ, et al., (2013) Galectin-9 activates and expands human T-helper 1 cells. *PLoS One*. 8(5): e65616. doi:10.1371/journal.pone.0065616.
33. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque Barreira MC, Silva JS (2001) KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania* major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 11(12): 1035–1042.
34. Coltri KC, Oliveira LL, Ruas LP, Vendruscolo PE, Goldman MH, et al. (2010) Protection against *Paracoccidioides Brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Med Mycol* 48: 792–799.
35. Travassos LR, Taborda CP (2012) Paracoccidioidomycosis vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 8(10): 1450–1453.
36. Marques AS, Cortez DB, Lastoria JC, Camargo RMP, Marques MEA (2007) Paracoccidioidomycose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. *An Bras Dermatol* 82: 411–417.
37. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. (2011) Immunology of paracoccidioidomycosis. *An Bras Dermatol* 86 (3): 516–525.

38. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van Der Graaf CA, Van Der Meer JW, et al. (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3712–3718.
39. Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, Mcnamara A, Jain AV, et al. (2009) Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol* 175: 2489–2500.
40. Ito JI (2011) T cell immunity and vaccines against invasive fungal diseases. *Immunol Invest* 40, 825–838.
41. Ruas LP, Bernardes ES, Fermino ML, DeOliveira LL, Hsu DK, et al. (2009) Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2-biased immunity. *PLoS One*. 4(2): e4519. doi:10.1371/journal.pone.0004519.
42. Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, et al. (2007) IL-13 induces disease promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 179: 5367–5377.
43. Haraguchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Matsuno Y, et al. (2010) Impairment of host defense against disseminated candidiasis in mice overexpressing GATA-3. *Infect Immun* 78: 2302–2311.
44. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, et al. (1998) Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 66(2): 800–806.
45. Figueiredo F, Alves LM, Silva CL (1993) Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* 93: 189–194.
46. Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE (2003) Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol* 41: 391–3998.
47. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pffer K, Rossi MA, et al. (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 156: 1811–1820.
48. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, et al. (1992) Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the

heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. J Immunol 162: 3504–3511.

49. Phillips K, Weinblatt M (2005) Granulomatous lung disease occurring during etanercept treatment. Arthritis Rheum 53: 618–620.

50. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR (2007) 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 196(7): 1108–1115.

51. Cyktor JC, Turner J (2011) Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. Infect Immun 79(8): 2964–2973.

52. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, et al. (2008) Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. Am J Pathol 173(2): 423–432.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cloning strategies for cloning the paracoccin ORF for expression. The left panel shows the standard strategy, with PCR amplification of the largest exon, restriction endonuclease digestion, and cloning into the expression vector pGEX-4T-1. The positions of the exons are displayed on the map of the gene. Genomic DNA template was extracted from *P. brasiliensis* strain Pb18. Agarose gel electrophoresis (mid-left) shows the corresponding band amplified by PCR. The exon 4 amplicon was cloned by *Bam*HI and *Eco*RI digestion. The right panel shows the strategy for synthesis of the predicted paracoccin sequence fused with the 5'-UTR elements for transcription in the vector pUC57. Green arrow, T7 promoter; black box, lacO (lac operator); and red box, the phage T7 trailer sequence for ribosome binding.

Figure 2. Electrophoretic profile of rPCN_{exon4} and rPCN_{full}. Panel A: Induction time/response rPCN_{exon4} detected in the lysates of *E. coli*. The time elapsed since IPTG induction is shown in hours. **Panel B:** The bound material to glutathione-sepharose was separated by 12% SDS-PAGE Coomassie blue staining revealed a single band (lane 1), which was recognized by specific antibodies against GST (lane 2) and PCNprep (lane 3). **Panel C:** rPCN_{full} was purified and evaluated for its ability to bind to *N*-acetylglucosamine. The bound

material was separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions, and then stained with Coomassie blue. Lane 1, material before refolding; Lane 2, material after refolding (a single band was detected with an apparent molecular mass of 28 kDa). Molecular markers were a mixture of pre-stained proteins (Fermentas). **Panel D:** The rPCN_{full} band was recognized by an anti-paracoccin antibodies (lane 2) and not by antibodies from pre-immune sera.

Figure 3: Biological and enzymatic properties of rPCN_{exon4} and rPCN_{full}. **Panel A:** production of TNF- α , **Panel B:** production of NO by induced murine macrophages following *in vitro* stimulation with PCNprep and rPCN_{exon4} or PCNprep and rPCN_{full}. Cells were harvested from the peritoneal cavity of C57BL/6 mice and induced with thioglycollate. Adherent cells were incubated for 48 h with different recombinant proteins (0.25 mg/mL), medium (negative control), or LPS+IFN γ (positive control). The standard deviation was calculated based on tests performed in triplicate. The activity of the samples was compared to that of the medium alone. **Panel C:** The PCNprep, rPCN_{exon4} and rPCN_{full} were assayed for NAGase activity. A colorimetric assay was performed in spectrophotometer set at $\lambda = 405$ nm. The standard deviation was calculated by analysis of experiments performed in triplicate. **Panel D:** Binding of rPCN_{full} to laminin. Different amounts of biotinylated recombinant protein were incubated with laminin (250 ng) coated in the microplate wells. The binding of the biotinylated protein was detected with a neutravidin-peroxidase conjugate and a chemiluminescent substrate. Luminescence readings are reported as relative luminescence units (RLU). **Panel E:** Inhibition of rPCN_{full} binding to laminin by sugars. Different concentrations of GlcNAc, D-glucose, and D-galactose were pre-incubated with the recombinant protein (100 ng), and the mixture was then added to the laminin-coated wells. The margin of error was calculated by analysis of triplicate experiments. Each sample with sugar was compared to a sample without sugar.

Figure 4. Anti-rPCN_{full} antibody reactivity on the yeast cell surface. Fluorescence labeling with anti-rPCN_{full} (**Panel A-D**) was evenly distributed over the yeast cell surface, with more intense labeling in some budding regions. Panel D is the merge of panels B and C.

Figure 5. Fungal burden, granuloma incidence, and histopathology in infected mice that received prophylactic administration of rPCN_{full}. Mice were infected (i.v.) with 10^6 *P. brasiliensis* yeast cells and analysis was performed on day 30 after infection. **Panel A:** Pulmonary CFU recovery. Each group of five mice was either not treated (injected with vehicle [PBS]) or prophylactically treated according to protocol G1, G2, G3, or G4. **Panel B:**

Morphometric analysis of lung sections in terms of granulomas/mm² of tissue, and according area of granuloma. Bars depict the means and SD. **P* < 0.05 *versus* the PBS group. **Panel C:** Lung histopathology of infected mice that received prophylactic administration of rPCN_{full}. Mice were infected (i.v.) with 10⁶ *P. brasiliensis* yeast cells and analysis was performed on day 30 after infection. The panels show representative lung sections from mice that were infected and not treated (PBS), or infected and prophylactically treated according to protocol 1 (G1), protocol 2 (G2), protocol 3 (G3), and protocol 4 (G4).

Figure 6. Prophylactic administration of rPCN_{full} increases proinflammatory cytokines and NO production. Mice were infected (i.v.) with 10⁶ *P. brasiliensis* yeast cells and analysis was performed 30 days after infection. IL-12p40 (A), IL-12p70 (B), TNF-α (C), IFN-γ (D), IL-4 (E), IL-10 (F), and NO (G) levels were measured in lung homogenates. Data are reported as the mean and SD of five mice per group and the experiments were performed in triplicate. **P* < 0.05 *versus* the PBS group.

Table 1. Prophylaxis groups

Groups	Treatment regimens (days before infection)
Control	PBS*
G1	17°, 10° and 3°
G2	10° and 3°
G3	10°
G4	3°

* Mice received PBS in a regimen similar to that of group 1.

FIGURE 1.

FIGURE 2.

FIGURE 3.

FIGURE 4.

FIGURE 5.

FIGURE 6.

Anexo II

Therapeutic Administration of Recombinant Paracoccin Confers Protection Against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection with Possible Involvement of TLR2

Ana Claudia Paiva Alegre¹, Flávia Costa Mendonça¹, Thiago Aparecida da Silva¹, Aline Ferreira Oliveira¹, Maria Cristina Roque Antunes Barreira¹.

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

ABSTRACT

Paracoccin is an N-acetylglucosamine binding lectin from *P. brasiliensis*. Recently, our group has shown that BALB/c mice to which recombinant paracoccin (rPCN) was prophylactically administered develop a Th1 protective response in response to fungal challenge. We now investigated the therapeutic effect of rPCN in experimental paracoccidioidomycosis (PCM). Four different regimens of rPCN administration were assayed to identify which were more protective. rPCN-treated mice showed lower frequencies of pulmonary granulomas, which occupied smaller areas in the lungs showed lower fungal detection in comparison to the lungs of untreated control mice. Moreover, lower CFU was recovered from lungs of treated mice. This protective effect was provided by all the regimens of rPCN administration, especially the group that received the protein 3 and 10 days after infection. The rPCN treatment was also associated with pulmonary higher levels of IL-12, IFN- γ , TNF- α , NO and IL-10, not accompanied by IL-4 augmentation.. Encouraged by the profile of cytokines detected in the lung of treated mice, we investigated the interaction of rPCN and TLRs. We verified that rPCN activates TLR2, homo or heterodimerized, as well as TLR4. In both cases, activation was not dependent on CD14 or CD36 coreceptors. Our results allow us to propose that paracoccin can be considered a TLR agonist able to trigger regulated Th1 immunity and exert therapeutic effect against *P. brasiliensis* infection.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM), first reported by Adolf Lutz in 1908, in Brazil, is an acute-chronic systemic mycosis, reported as autochthonous to Latin America, whose incidence extends from southern Mexico to northern Argentina (Marques et al., 2012). The infection is initiated by inhalation of airborne propagules that become pathogenic yeast after

reaching the alveolar epithelium (Brumer et al., 1993). In the lung, some genes responsible for transformation of infective to pathogenic form are stimulated on the body temperature of the host (San Blas-and-San Blas, 1984; Mcewen et al, 1987).

The disease is characterized by lung impairment and may spread to the other organs and systems (Kwon-Chung et al. 1992), producing secondary injuries to the mucosa, skin, lymphoid nodules and adrenal glands. Usually, incapacitating sequel can appear (mainly pulmonary fibrosis), and in the absence of effective therapy, PCM progresses and may be lethal (Brummer et al., 1993). The structure of granulomas, predominant in human and experimental PCM, is involved directly with infection progression in PCM, and it is intimately related to the immune response of the host. The paracoccidioidal granulomas perform an immune-specific response of the host against the fungus in an attempt to kill and contain *P. brasiliensis*, preventing its multiplication and dissemination (Franco et al., 1987).

The immune response developed by infected individual is primarily responsible for the clinical and pathological manifestations of PCM. It is known that patients with active disease often have depressed cellular immunity, characterized by decreased production of Th1 cytokines and increased levels of Th2 cytokines, which does not protect the host (Bernard et al., 2001) and inhibits macrophage functions and differentiation of Th1 cells (Calich and Kashino, 1998). On the other hand, resistance to fungal infection is linked to the Th1 mediated-immune response which is triggered by IL-12 cytokine. Once secreted, IL-12 acts on T lymphocytes, resulting in the production of high levels of IFN- γ (Calich et al, 1998; Cano et al, 1998; Peraçoli et al., 2003; Souto et al, 2000; Livonesi et al, 2008). The cellular immune response is responsible for suppression of fungal replication and maintaining the balance between host and parasite (Mamoni and Blotta, 2005).

The IL-12 cytokine is primarily produced as result of activation of antigen presenting cells (APCs), as such as macrophages cells. One of the main receptors involved in the first step of macrophage activation are the Toll Like Receptors (TLRs). These receptors are expressed in phagocytic cells and Dendritic Cells (DCs). Recognizing the Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), triggers the release of inflammatory cytokines and type I interferons, which are important for host defense (Beutler et al., 2009). This ability of the TLRs to promote the production of cytokines by antigen-presenting cells (APCs) makes them play an important role in the development of adaptive immune response (Brown, et al., 2010). Thus, the recognition of fungal particles in phagocytic cells via TLR, results in the

expression of genes of innate response with regulatory properties of adaptive response (Mcinturf et al., 2005).

Currently, the treatment of systemic mycoses is made with anti-fungal agents derived from azole and amphotericin-B (Graybill et al., 2000; Gubbins et al., 2005) and, in immunodepressed patients, the *P. brasiliensis* yeast cells replicate intensively due to deficiency of a response of the innate and adaptive immunity (Travassos et al., 2008). Numerous investigations using antigens of the fungus itself capable of inducing effective cellular immune response and host protection have been undertaken in trying of alternative therapeutic methods for treatment of PCM (Reis et al., 2008). The literature is rich in statements that immunomodulatory molecules are of great interest, since they are able to modulate the immune system to respond effectively against intracellular pathogens (Marques et al., 2006; Segal et al., 2006; Ribeiro et al., 2009).

Recently, our group has shown that BALB/c mice prophylactically treated with recombinant paracoccin (rPCN), an N-acetylglucosamine binding lectin from *P. brasiliensis*, is able to develop a Th1 protective response during PCM (Alegre et al., 2014). Since the main mechanism of defense to *P. brasiliensis* infection is the cell-mediated immune response, we determined whether therapeutic administration of rPCN could modify the course of experimental PCM. Our results demonstrate that the therapeutic administration of rPCN protects against PCM resulting in a drastic reduction of pulmonary lesions and fungal burden compared to control mice. Furthermore, we observed that rPCN is able to activate the production of IL-8 in HEK293T cells transfected with different TLRs. The glycosylation present in these receptors are targets for recognition by recombinant lectin, and this interaction may be responsible for protection in animals infected with *P. brasiliensis*.

MATERIALS and METHODS

Ethics statement

All *in vivo* testing was approved by the Ethical Committee for Ethics in Animal Research (CETEA) of the School of Medicine at Ribeirao Preto of the University of Sao Paulo. All efforts were made to minimize suffering, and the animal experiment was conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) (Protocol 20/2013-1).

Mice and *P. brasiliensis* strain

In this study we used 6-to-8-week-old male BALB/c mice. They were bred and maintained under standard animal housing conditions in the animal house at the Ribeirao Preto School of Medicine, Sao Paulo University, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

The *P. brasiliensis* isolate, Pb18, was used to mice infection. Virulence of Pb18 yeast cells were maintained by periodic passages in mice, with subsequent recovery in BHI-agar culture. Before experimental infection, the yeast were grown in liquid BHI (Brain Heart Infusion-HiMedia, Mumbai, India) medium, 3-7 days at 37°C under gentle agitation. The fungal cells were washed in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and counted in a Neubauer chamber. The viability of the yeast cells was determined by fluorescein diacetate and ethidium bromide staining (Calich *et al.*, 1979), and it was always higher than 90%. Each experimental group consisted of five mice and the assays were done in triplicate.

Purification of recombinant paracoccin (rPCN)

Recombinant paracoccin was expressed in *Escherichia coli*, as previously described (Alegre *et al.*, 2014). Once the recombinant protein is an N-acetylglucosamine-binding lectin, it was purified by affinity chromatography on an N-acetylglucosamine column. The residual LPS was removed using an immobilized polymyxin B agarose column (BioRad, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. For *in vitro* assays, in addition to column purification, proteins were preincubated for 1 h at room temperature (RT) with polymyxin.

Infection of mice and therapeutic rPCN administration

BALB/c mice were infected by intravenous injection (i.v.) with 0.1 mL of a suspension containing 10^6 *P. brasiliensis* yeast cells. The uninfected control mice were inoculated with 0.1 mL of sterile pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS). After infection, mice were injected subcutaneously (s.c.) with 0.5 µg of rPCN in 0.1 mL of sterile PBS. The treatment varied in terms of the number of rPCN injections (one to three doses), and the time intervals between the rPCN injection after the challenge with *P. brasiliensis* (Table 1). The control group, which received a similar regimen, was injected with PBS instead of rPCN. The course of infection was evaluated on days 30 after challenge.

Table 1. Therapeutic groups

Groups	Treatment regimens (days after infection)
Control	PBS*
G1	3°, 10° and 17°
G2	3° and 10°
G3	10°
G4	3°

* The animals received PBS in a regimen similar to that of group 1.

Histopathologic analysis

On day 30 post infection, the mice lungs were excised, fixed in 10 % formaldehyde for 24 h, and embedded in paraffin for sectioning. The tissue sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis by light microscopy with an Axiophot photomicroscope (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany), coupled with a JVC TK-1270 camera (Victor Company of Japan Ltd., Tokyo, Japan). The Gomori's Methenamine Silver (GMS) stain was done for visualization of the fungus in the granulomas. Histopathological changes were analyzed based on the size and the number of granulomatous lesions.

Fungal burden in the lung of infected mice

Mice were euthanized 30 days after i.v. infection, and fungal burden was determined by colony forming units (CFU). One lung per animal was aseptically removed, weighed, and homogenized in 1.0 mL of sterile PBS using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25 Basic; IKA Works, Inc., Wilmington, DE, USA). The final suspension was placed on solid BHI medium supplemented with 4 % (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Invitrogen, Life Technologies, Camarillo, CA, USA). Gentamycin (Gibco, BRL) was added at 96 µg/mL. Petri dishes were incubated at 37°C for 7–14 days, and colonies were counted (1 colony = 1 CFU). The results were expressed as the number of viable *P. brasiliensis* colonies per gram of organ, which was given as the mean and standard deviation (SD) duplicate samples.

Cytokines Measurement

After plating, the lung homogenates were centrifuged at $2.000 \times g$ for 15 min, and the supernatants were stored at -20°C. The levels of IL-12p70, IL-4, IL-10, tumor necrosis factor (TNF-α), interferon gamma (IFN-γ), in the supernatants of the lung homogenates, were

measured by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antibody pairs purchased from Pharmingen (Pharmagen, San Diego, CA, USA). The ELISA procedure was performed according to the manufacturer's protocol. The concentrations of cytokines were determined with reference to a standard curve generated by recombinant murine cytokines. Absorbance was read at 450 nm in microplate scanning spectrophotometer (Power Wave-X, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Results were expressed in pg/mL.

Nitric Oxide production

The nitric oxide (NO) production was quantified in the lung supernatants by using the standard Griess reaction [28]. Briefly, 50 μ L of supernatant from the lung homogenates were incubated with an equal volume of Griess reagent (1 % sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, and 2.5 % H_3PO_4), at room temperature (RT) for 10 min. The absorbance at 550 nm was determined with a microplate reader. The conversion of absorbance to micromolar (μM) NO was deduced from a standard curve by using a known concentration of NaNO_2 . All the results were expressed as μM NO, and the values were performed in triplicates.

Cell Culture and Transfection

Human embryonic kidney 293 T (HEK293T) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT), at 37°C, in a humidified incubator, under an atmosphere containing 5 % CO_2 . Cells were plated in 12-well plates (5×10^5 cells/well). After overnight incubation, the cells (about 80 % confluence) were transiently transfected with plasmids encoding various TLRs, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendations. The total amount of DNA per well was normalized to 2 mg, by adding the empty vector. All plasmids used for transfection were purified with the Endofree plasmid kit (Qiagen, Chatworth, CA). After 24 h, the cells were transferred to 96-well plates (4×10^4 cells/well). For transfection of mutant TRL2, HEK293T cells were plated in 96-well plates (3.5×10^4 cells/well), and after 24 h were transiently transfected with constructs encoding the TLR2 wild type (not mutated) or with constructs encoding different mutants. The next day, cells were stimulated, during 20 h, with Pam3CysK4 (P3CSK4, EMC microcollections) for TLR2/1, fibroblast stimulating ligand-1 (FSL-1, EMC microcollections) for TLR2/6, and LPS-EB ultrapure (Standard LPS, *E. coli* 0111:B4) for TLR4. The transfection was confirmed by detection of IL-8 in culture

supernatants, using the OptEIA Human IL-8 ELISA kit (BD Biosciences). The results represent the mean and SD of values in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses of the differences between the means of experimental groups were performed applying analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey posttest, using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All *in vivo* experiments were performed three different times, with a total of 5 animals in each group. The *in vitro* assay were done in duplicate or triplicate. *P* values < 0.05 indicated statistical significance.

RESULTS

Effect of therapeutic rPCN administration on pulmonary fungal load and histopathology

We first evaluated whether the therapeutic administration of rPCN is able to interfere in the course of PCM in the murine experimental model. For this, groups of BALB/c mice were i.v. challenged with *P. brasiliensis* yeasts, and submitted to different regimens of rPCN administration, which varied according to the number and injection time intervals (see Table 1, Materials and Methods). The fungal CFU recovered from the lungs, 30 days post-infection, were significantly higher in untreated control group compared with all rPCN-treated groups (Fig. 1B).

Histopathology examination of the lungs sections showed that rPCN-treated mice exhibited compact, individualized, and well organized granulomas, regardless of the administration regimen. On the other hand, a diffuse inflammatory reaction, with coalescent granulomas was verified in the lungs of untreated control mice (Fig 1A). Silver staining revealed a larger amount of yeast inside the granulomas of control mice compared with the yeast numbers visualized in the granulomas of rPCN-treated mice (Fig. 1A).

Morphometric analysis demonstrated a significantly lower granuloma density in the lungs of mice from rPCN-treated groups (approximately 0.6 granulomas/mm²), compared to the control group (2 granulomas/mm²) (Fig. 1C). Additionally, the total area occupied by the granulomas was significantly lower in the lung of the animals from the groups 1, 2, and 3 in relation to the control animals (Fig. 1D).

These results demonstrated that therapeutic administration of rPCN is involved in the development of an effective inflammatory reaction and in the control of fungal burden, regardless of the inoculation regimen.

Cytokines and NO production by rPCN-treated and control mice, after challenge

Since the therapeutic rPCN treatment was effective in protecting mice against *P. brasiliensis* infection, we investigated the profile of immune response developed. For this, the lung homogenates were obtained 30 days post challenge, and the cytokines and nitric oxide production were evaluated.

The levels of IL-12p40 (Fig. 2A) and IFN- γ (Fig. 2B) were significantly higher in groups 2 and 3 than in control group. Additionally, the group 1 also produced high levels of IFN- γ , which were different from the control group. The production of TNF- α (Fig. 2C), IL-4 (Fig. 2D), and IL-10 (Fig. 2E) were similar among the groups. Only the group 4 and 2 produced higher concentrations of TNF- α and IL-10, respectively.

In accordance with the inflammatory profile verified, significantly higher NO levels were detected in the lung homogenates of mice from groups 2, 3, and 4, compared with the control mice (Fig. 2F).

These results indicate that the protection against *P. brasiliensis* infection, conferred by therapeutic administration of rPCN, is associated with the development of a T-helper 1 immunity in the host.

rPCN leads activation of TLRs even in the absence of co-receptors

Because initial IL-12 production by phagocytes can be resulted of the interaction of Toll-like receptors (TLRs), on the cell surface, with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), we next evaluated whether rPCN is able to induce activation of TLR4, and homodimer or heterodimer TLR2. Thus, HEK293T cells were transfected with plasmids encoding TLR2, TLR2/1, TLR2/6, and TLR4, and stimulated for 20 h with a known PAMP or with different rPCN concentrations. The TLRs activation was verified by detection of IL-8 in culture supernatants by ELISA.

All assayed rPCN concentrations were able to interact with TLR2/1 (Fig. 3A), TLR2/6 (Fig. 3B), and TLR4 (Fig. 3C), and triggers them, resulting in the production of IL-8 by transfected cells. However, this activation was shown to occur independently of the CD14 and CD16 coreceptors involvement (Fig 4). The IL-8 production decreased 16 % and 24 % in

the absence of TLR2 heterodimerization with TLR1 and TLR6, respectively (Fig. 5), showing that although rPCN interacts with homodimer TLR2, the heterodimerization with TLR1 and TLR6 significantly contributes to cell activation. These data may represent the mechanism by which rPCN is able to generate protection in animals during PCM.

rPCN can interact with TLRs through carbohydrate recognition

Since rPCN presents one carbohydrate recognition domain (CRD), and TLR2 presents four N-glycosylation sites in its ectodomain, we investigated whether these N-glycans were target for rPCN recognition. For this, HEK293T cells were transfected with plasmids encoding TLR2 wild type or with TLR2 mutants, presenting absence of one or more N-glycosylation sites. After 20 h of rPCN incubation with the cells expressing the wild type and mutants TLR2, the levels of IL-8 in culture supernatants were evaluated.

The levels of IL-8 produced by cells transfected with the TLR2 mutants were significantly lower than the verified in the culture of cells transfected with the TLR2 wild type (Fig. 6). Our results indicate that the fourth glycosylation site represents the most important target of rPCN recognition, once in the absence of the 3 others N-glycosylation sites (D6 mutant), the conservation of the fourth site is enough to induce the IL-8 productions at similar levels than the observed in the control cells (A6) (Fig 6).

DISCUSSION

The incidence of fungal infections is increasing; hence the development of new therapies for these diseases has become a major public health importance (Goes et al., 2005). rPCN is a lectin with immunomodulatory activity capable of inducing cell-mediated immunity, protective against intracellular pathogens. Previous studies showed that the prophylactic administration of rPCN confers resistance to animals infected with *P. brasiliensis* (Alegre et al., 2014). These results prompted us to investigate the effect of rPCN administration after the challenge with the fungus. The protocols were designed based on therapeutic administration of the plant lectin ArtinM in mice, which succeeded in resistance to murine PCM (Coltri et al., 2008). The treatment of mice varied in terms of the number of rPCN injections (one to three doses), and the time intervals between the rPCN injection after the challenge with *P. brasiliensis*. We found that therapeutic administration of rPCN conferred protection against PCM, which was associated with a clear reduction of the disease severity.

The granulomas play an important role in host defense against the fungus, even in human and experimental PCM (Kerr et al., 1988). Some evidence suggests that granuloma formation is closely related to the host immune response, representing a more specialized and efficient response of host tissue in an attempt to block and contain the infection by the fungus, preventing their multiplication and dissemination (Fortes et al., 2011). Our results demonstrated that all mice treated with rPCN, showed significantly lower frequencies of pulmonary granulomas and these granulomas had smaller areas and decreased fungal burdens, in comparison with control mice, which received only PBS. The lung parenchyma of these control animals was almost completely replaced by large lesions with high fungal loads. This result is in accordance with literature findings, showing that patients with localized chronic disease present formation of compact granules with few fungus cells, different of patients with the acute form (Moscardi-Bacchi et al., 1994; Cano et al., 1995; Del Sero et al., 1999).

Previous studies have shown that the PCN presents interesting effects on cells of the immune system, and in general, lectins are potential immunomodulatory agents (Coltri et al., 2006) (Souza et al., 2013; Gooden et al., 2013). Here, we show that the protection conferred by therapeutic administration of rPCN, also was associated with the development of a Th1 immune response, evidenced by increased production of proinflammatory cytokines and nitric oxide in the mice treated with two doses of rPCN, on day 3 and day 10 after the infection, as compared to the control group. This group also showed the high levels of IL-10 prevented exacerbated inflammatory lesions. During the course of the PCM, the Th1 subset of CD4⁺ T cells synthesize cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-12 that protect the host by preventing the dissemination of the fungus (Bernard et al., 2008; Parise-Fortes et al., 2006; Calvi et al., 2003; Romano et al., 2002). In a different way, Th2 immune response is inefficient to contain the infection (Pagliari and Souto, 2003).

TLRs are critical receptors in the activation of innate immunity cells with subsequent production of mediators, such as IL-12. Such mediators are used in the elimination of the pathogen, and to control essential mechanisms that induce and regulate the adaptive immune response. They are important to many aspects of microbial elimination, including recruitment of phagocytes at the site of infection, microbial death and activation of dendritic cells (DCs), which become immunogenic and are capable to induce full activation of T cells (Reis and Sousa, 2004). We observed that HEK293T cells transfected with a pair of TLR2/1 and TLR2/6 and transfected with TLR4, when stimulated with different concentrations of rPCN, were able to induce IL-8 production. These results may represent the mechanism by which the

recombinant lectin was able to induce the production of IL-10 and IL-12, when administrated *in vivo* during the course of PCM. Literature demonstrates that activation of TLR4 stimulates the synthesis of proinflammatory cytokines (Van der Kleij et al., 2002; Diterich et al., 2003), while TLR2 is associated with IL-10 production (Nigou et al., 2001). TLR2 may recognize some ligands as homodimers or as heterodimer, in association with other molecules of different TLR (Massari et al., 2002; Wetzler, 2003). Our results showed that independent of how TLR2 presents, homo or heterodimeric, rPCN triggers the production of IL-8 very similarly in all combinations formed by the receptor. Although TLRs can directly recognize to their respective PAMPs (Bell et al., 2005; Iwaki et al., 2002; Lien et al., 2000; Mizel et al., 2003; Poltorak et al., 2000), additional molecules such as CD14 and CD36, can increase recognition and signaling in some TLRs (Sellati et al., 1998; Vasselon et al., 2004; Wetzler, 2003; Wooten et al., 1998; Hoebe et al., 2005). The lack of these accessory molecules did not compromise the production of IL-8 by cells stimulated with rPCN. Probably the lectin directly recognizes the TLRs, and this recognition can be via carbohydrate. Previous results showed that rPCN preserves its carbohydrate recognition domain (CRD) active, with affinity for N-acetylglucosamine (Alegre et al., 2014). TLR2 has in its ectodomain four N-linked glycosylation sites important for function and secretion of these molecules at the cell surface (Weber et al., 2004). Using mutant for N-glycosylation sites of TLR2, we found that rPCN induces increased production of IL-8 when the fourth N-glycosylation site is preserved.

In conclusion, we have showing that rPCN can be protective against *P. brasiliensis* experimental infection, extending to other diseases whose protective immunity dependent induction of a Th1 response.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2010/01112-9). We thank Luciana Pereira Ruas and Mateus Silveira de Freitas for helpful intellectual discussions, and Mrs Sandra M. O. Thomaz, Patricia E. Vendrusco, Vani M. A. Correa and Antonio Renato Meirelles e Silva for excellent technical assistance. The histological morphometric analysis was performed in the Laboratory of Applied and Experimental Neurology of the Medical School of Ribeirao Preto, USP.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Therapeutic treatment with rPCN decreases fungal burden and lung injury in *P. brasiliensis*-infected mice lung. Lung histopathology of *P. brasiliensis*-infected mice treated therapeutically with rPCN. **Panel A:** Lung histopathology. The panels show representative lung sections from mice that were infected and not treated (PBS); that were infected and therapeutically treated according to different protocols (G1, G2, G3 and G4) and that were not infected (uninfected). **Panel B:** Morphometric analysis of lung sections in terms of area of granuloma (μm^2). **Panel C:** Morphometric analysis according of granulomas/ mm^2 of tissue. **Panel D:** Pulmonary CFU recovery. The capture of the images was performed using Carl Zeiss Axiophot microscope coupled to a camera JVC TK1270. For measurement of lesions in the lung and the incidence, was used the Image J program (developed by Wayne Rasband of the National Institute of Mental Health). Bars depict the means and SD. $*P < 0.05$ versus the PBS group.

Figure 2. Therapeutic administration of rPCN_{full} increases proinflammatory cytokines and NO production. The lung homogenates were analyzed for IL-12p40 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-10 (D), IL-4 (E) and NO (F). Data are representative as the mean and SD of five mice per group and the experiments were performed in triplicate. $*P < 0.05$ versus the PBS group.

Figure 3. rPCN trigger TLR-mediated activation cell. HEK293T cells were all transfected with CD14 and CD36, associated with a pair of TLR2/1 and TLR2/6 (**panels A and B**, respectively) or with TLR4 (**panel C**). The total amount of DNA for each transfection was kept constant using an empty expression vector. The cells were stimulated with different concentrations of rPCN, previously incubated with polymyxin, at 37°C for 20 h. The agonists were used as positive controls: PAM3CysSK4 for TLR2/1, fibroblast stimulating ligand-1 (FSL-1) for TLR2/6 and bacterial lipopolysaccharide (LPS) for LR4. Polymyxin B was added to neutralize LPS. Medium and empty vector were used as negative controls. Cells supernatant was analysed for IL-8 by ELISA. Statistical comparison is between transfected cells stimulated with medium. The results were significant when (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ or (****) or $p < 0.0001$.

Figure 4. The absense of CD14 and CD36 does not affect the activation of TLRs stimulated with rPCN. Comparison of IL-8 production triggered by rPCN stimulation of HEK293T expressing CD14 and CD36, associated to TLR2/1 (**panel A**) or TLR2/6 (**panel B**), with HEK293T cells whose expression of one coreceptor was omitted. The HEK293T cells were stimulated with rPCN previously incubated with polymyxin. Positive controls were P3CSK4 for TLR2/1 and FSL-1 for TLR2/6. Medium and empty vector were used as negative controls. Results are representative of three independent experiments. Statistical differences compared the response provided by cell lacking one of the coreceptors with the response detected when both coreceptors were transfected sob the same stimuli. Values are mean $\pm$ S.D. asterisks indicate (***) $p < 0,001$ or (****) $p < 0,0001$.

Figure 5. The homodimerization of TLR2 does not affect the production of IL-8 by rPCN. HEK293T cells were transfected with CD14, CD36 in the presence or absence of TLR2, TLR1 and TLR6. After 48 h of transfection, cells were stimulated with respective agonists, P3CSK4 for TLR2/1, FSL-1 for TLR2/6 and rPCN previously incubated with polymyxin. **Panel A:** cells transfected with TLR2 and TLR1. **Panel B:** cells transfected with TLR2 and TLR6. Medium and empty vector were used as negative controls. Results are representative of five independent experiments. Statistical differences compared the response provided by homodimerization and heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6. Values are mean $\pm$ S.D. asterisks indicate (*) $p < 0,05$ or (**) $p < 0,01$ or (***) $p < 0,001$ or (****) or $p < 0,0001$.

Figure 6. Decreased levels of activation when HEK293T cells are transfected with different mutants of TLR2. HEK293T cells expressing TLR2 with four glycosylation sites (WT - not shown) or mutants of the N-glycosylation sites were stimulated with rPCN. The results were obtained by comparative analysis between the mutant receptor and WT receptor. FSL-1 was used as a positive control and medium as negative control (data not shown). After 20 h of stimulation the supernatant was used for detection of IL-8. The mutated sites (missing N-glycans) are represented by traces in red, while the sites are preserved are in black. Results are representative of two independent experiments.

FIGURE 1.

FIGURE 2.

FIGURE 3.

FIGURE 4.

FIGURE 5.

FIGURE 6.