UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

NATÁLIA KETELUT CARNEIRO

*Modulação da resposta imune contra
Paracoccidioides brasiliensis pelas vias canônica e
não canônica do inflamassoma: participação da
IL-1 β , IL-18 e IL-1 α no controle da infecção*

RIBEIRÃO PRETO
2017

NATÁLIA KETELUT CARNEIRO

*Modulação da resposta imune contra
Paracoccidíoides brasiliensis pelas vias canônica e
não canônica do inflamassoma: participação da
IL-1 β , IL-18 e IL-1 α no controle da infecção*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. João Santana Silva

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Ketelut-Carneiro, Natália

Modulação da resposta imune contra *Paracoccidioides brasiliensis* pelas vias canônica e não canônica do inflamassoma: participação da IL-1 β , IL-18 e IL-1 α no controle da infecção. Ribeirão Preto, 2017.

190p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Silva, João Santana

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Paracoccidioidomicose experimental 3. Inflamassoma. 4. Vias canônicas e não canônicas. 4. Caspases (1, 11 e 8). 5. IL-1 β , IL-18 e IL-1 α

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / FAPESP (2013/21295-9 e 2014/24503-4).

Nome: KETELUT-CARNEIRO, Natália

Título: Modulação da resposta imune contra *Paracoccidioides brasiliensis* pelas vias canônica e não canônica do inflamassoma: participação da IL-1 β , IL-18 e IL-1 α no controle da infecção

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Santana da Silva Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Lúcia H. Faccioli Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Roberto Martinez Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues Instituição: Fundação Oswaldo Cruz

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado Instituição: Universidade Federal do Pará

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Selma, que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao observar a trajetória percorrida e as grandes oportunidades de aprendizado que foram a mim proporcionadas, ficaria difícil começar os agradecimentos sem mencionar minha família. Obrigada *Deus*, pelos pais, *Paulo Augusto de Lucena Carneiro* e *Selma Cristina Ketelut Carneiro* que tu me destes. Tudo o que sou, tenho e espero vieram deles. O amor incondicional transformou os meus sonhos em suas vontades, minhas tristezas em suas lágrimas e minhas alegrias em suas vitórias. A caminhada foi longa e, com toda certeza, sem vocês eu não conseguiria. Vocês são meu alicerce. Tomara que no futuro eu consiga fazer pelos meus filhos metade do que vocês fizeram por mim e pela minha irmã.

À minha irmã, *Isadora Ketelut Carneiro*, por ser a melhor parte de mim. Com você ao meu lado sei que nunca estarei sozinha. Gratidão eterna por tê-la em minha vida.

Ao meu marido *Lucas Araujo Garcia*, pelo amor, carinho e compreensão. As minhas preocupações foram compartilhadas e sentidas por você numa união que me incentivou a prosseguir. Você me deu forças para buscar e conquistar meus sonhos.

Ao *Prof. Dr. João Santana* por ter acreditado no meu potencial. Obrigada pela oportunidade, pelos anos de crescimento científico/intelectual e por ser um exemplo de dedicação à ciência.

À *Profa. Dra. Katherine Fitzgerald* por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório. Foi fantástico fazer parte do seu grupo!

Aos professores *Dr. Dario Zamboni* e *Dr. Florêncio Figueiredo* pela excelente colaboração.

À *Prof. Dra. Vanessa Carregaro* pela atenção, apoio e discussões científicas.

Ao grupo das fanáticas por *P. brasiliensis*, *Camila Oliveira Silva e Souza*, *Fabrine Massafra Tristão* e *Fernanda Agostini Rocha*. Vocês foram *flowers* no meu dia-a-dia. Tudo ficava mais leve quando estávamos trabalhando juntas.

Às *Dra. Grace Kelly Silva*, *Dra. Luciana Benevides* e *Msc. Laís Amorim Sacramento* pela amizade, entusiasmo e ajuda nos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Imunoparasitologia, *Claudinha*, *Fred*, *Herculano*, *Bruna*, *Franciele*, *Daniela*, *Gabriela*, *Jefferson* e *Alynn* pela convivência.

Ao auxílio técnico, *Cristiane Milanezi*, *Wander C. Damião*, *Denise Ferraz*, *Olinda Mara Brigato* e *Vera Lúcia Aguillar Epifânio*, por serem tão prestativos.

Aos funcionários do biotério, *Julio A. Siqueira*, *Edinelson Mazzotto*, *Rubilan C. Quineiro* e *Adriana Sestari* por cuidarem com tanto zelo dos camundongos.

À secretária *Ana Cristine S. Ferreira* pela paciência, profissionalismo e por facilitar os assuntos burocráticos.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada*, representado pelos docentes, pela contribuição durante a minha formação.

Aos *Membros da Banca* pela disponibilidade e por contribuírem significativamente para a melhoria do meu trabalho.

À *FAPESP*, *CNPq* e *FAEPA* pelo incentivo financeiro.

*"A ciência é a disposição para aceitar os fatos,
mesmo quando eles são opostos aos desejos" .*

(Burrhus Frederic Skinner)

RESUMO

KETELUT-CARNEIRO, N. **Modulação da resposta imune contra *Paracoccidioides brasiliensis* pelas vias canônica e não canônica do inflamassoma: participação da IL-1 β , IL-18 e IL-1 α no controle da infecção.** 2017. 190 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A lesão granulomatosa é caracterizada como um agregado compacto de fagócitos maduros formado em resposta à um estímulo persistente. Os mediadores pró-inflamatórios da família da IL-1, ao promoverem a ativação da imunidade inata e o remodelamento tecidual descontrolados, geram a fisiopatologia da paracoccidioidomicose, doença pulmonar granulomatosa causada pelo fungo *P. brasiliensis*. A principal via inflamatória envolvida na secreção de IL-1 β , IL-18 e IL-1 α é a ativação dos inflamassomas, complexos protéicos conhecidos pela sua capacidade de ativar proteoliticamente a enzima caspase-1. Neste estudo abordamos os mecanismos subjacentes às vias canônica e não canônica do inflamassoma, avaliando a importância funcional das caspases 1, 11 e 8 na resistência do hospedeiro durante a infecção por *P. brasiliensis*. Demonstramos que a resposta imunológica protetora mediada pelo IFN- γ , após a liberação de IL-18 pela via da caspase-1, é o principal mecanismo responsável pelo controle fúngico quando o dano celular desencadeado pelo fungo é reconhecido pelo inflamassoma de NLRP3. No entanto, apesar do papel importante da caspase-1 na maturação da IL-1 β , a falta de caspase-1 apenas reduz parcialmente os níveis de IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis*. Ao contrário do esperado, a deficiência de caspase-11 não prejudicou a produção de IL-1 β , mas em vez disso, preveniu, na célula, a morte por piroptose e a secreção IL-1 α , citocina importante para restringir o crescimento fúngico através da síntese de IL-17. Por fim, observamos que a ativação de caspase-8 pela sinalização de MyD88 / Syk, além de mediar a maturação da IL-1 β , que acontece de maneira independente de caspase-1 e 11, é necessária também para o funcionamento eficiente da via canônica de caspase-1, demonstrando uma rede interligada entre as vias canônica de caspase-1 e não canônica de caspase-8 para coordenar o processamento da IL-1 β . Em conjunto, nossos resultados mostram contribuições distintas das vias canônica e não canônica do inflamassoma na produção de citocinas da família da IL-1, enfatizam a versatilidade desta plataforma em recrutar várias proteínas efetoras para adequar a resposta imunológica antifúngica e evidenciam a complexidade envolvida nas interações patógeno-hospedeiro.

Palavras-chave: *P. brasiliensis*; vias canônica e não canônica do inflamassoma, caspases(1, 11 e 8), IL-1 β , IL-18 e IL-1 α .

ABSTRACT

KETELUT-CARNEIRO, N. **Modulation of immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* by canonical and non-canonical inflammasome pathways: IL-1 β , IL-18 and IL-1 α in controlling the infection.** 2017. 190 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Granuloma is a lesion characterized by a compact aggregate of mature phagocytes arising in response to a persistent stimulus. By driving uncontrolled innate immunity and tissue remodelling, IL-1 family pro-inflammatory mediators govern the pathophysiology of paracoccidioidomycosis, a granulomatous lung disorders caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. A major inflammatory pathway involved in IL-1 β , IL-18 e IL-1 α secretion is the activation of inflammasomes, large multimolecular complexes best known for their ability to control activation of the proteolytic enzyme caspase-1. In this study we addressed the mechanisms that underlie canonical and non-canonical inflammasome pathways, assessing the functional importance of caspase-1, caspase-11 and caspase-8 in the regulation of inflammasome-mediated host resistance during *P. brasiliensis* infection. We found that IFN- γ -mediated protective immune response following by caspase-1- dependent IL-18 release after is the key mechanism responsible for the fungal control after *P. brasiliensis*-induced cell damage recognition by NLRP3 canonical inflammasome pathway. Nonetheless, despite the important role of caspase-1 in the IL-1 β maturation, the lack of caspase-1 only partially reduced IL-1 β levels during *P. brasiliensis* infection. Unlike caspase-1, caspase-11 deficiency did not impair IL-1 β production, cytokine strictly secreted by canonical caspase-1 inflammasome pathway. Instead, *P. brasiliensis*-triggered caspase-11 activation in an ill-defined manner leads to a rapid pore-mediated cell lysis and is required for IL-1 α production during *P. brasiliensis* infection. IL-1 α , in turn, is important for promoting the restriction of fungal growth trough IL-17-based inflammation. Finally, the caspase-8 induction by dectin-1/Syk signaling besides playing a role in mediating the caspase-1/11-independent IL-1 β maturation is also required to efficient canonical caspase-1 inflammasome pathway, demonstrating a connected network between non-canonical caspase-8 and canonical caspase-1 inflammasome pathways to coordinate IL-1 β . Taken together, our results revealed distincts contributions of both canonical and non-canonical inflammasome pathways in IL-1 family cytokine production and emphasizes the versatility of this platform to recruit several effector proteins to tailor the antifungal immune response, shedding new light on the complexity of this host-pathogen interaction.

Keywords: *P. brasiliensis*; canonical and non-canonical inflammasome pathways, caspases(1, 11 and 8), IL-1 β , IL-18 and IL-1 α .

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Paracoccidioidomicose: características gerais e epidemiologia.....	22
1.2 Agente etiológico da paracoccidioidomicose	25
1.3 Manifestações clínicas da paracoccidioidomicose	30
1.4. Relação parasito-hospedeiro na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	33
1.5. O granuloma paracoccidióidico	39
1.6. Resposta imune inata contra <i>P. brasiliensis</i> : receptores do tipo <i>Toll</i>	42
1.7. Membros da família do receptor de IL-1 e seus ligantes.....	46
1.8. Os receptores do tipo <i>Nod-like</i>	51
1.9. Os inflamassomas e suas vias.....	53
1.9.1. Via canônica do inflamassoma de NLRP3.....	56
1.9.2. Vias não canônicas do inflamassoma de NLRP3	58
2. OBJETIVOS.....	64
3. MATERIAL E MÉTODOS	66
3.1. Cultura de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	66
3.2. Preparo das leveduras para inóculo.....	66
3.3. Viabilidade das leveduras..	66
3.4. Animais experimentais e infecção por Pb18.	67
3.5. Recuperação de fungos e contagem do CFU.	68
3.6. Obtenção do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).	68
3.7. Dosagem de citocinas por ELISA.....	69
3.8. Análise histopatológica das lesões.	69
3.9. Isolamento de leucócitos pulmonares.	70
3.10. Citometria de fluxo..	71
3.11. Reação de Imunohistoquímica (IHQ).	71

3.12. Extração de RNA total de tecido pulmonar.	72
3.13. Síntese de cDNA.....	73
3.14. Reação de PCR em Tempo Real (qPCR).....	73
3.15. Diferenciação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea.	75
3.16. Diferenciação de células dendríticas a partir de células da medula óssea.	76
3.17. Marcação da caspase-1 ativa.	77
3.18. Atividade de caspase-8.....	77
3.19. Ensaio de formação de poro.	77
3.20. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH).	78
3.21. <i>Western blotting</i>	79
3.22. Ensaio de oligomerização de ASC.....	80
3.23. Imunofluorescência.	80
3.24. Análise estatística.	81
4. RESULTADOS	83
4.1. A infecção por <i>P. brasiliensis</i> ativa caspase-11 em macrófagos	83
4.2. Caspase-11 é necessária para a formação de poros e liberação de LDH	85
4.3. Caspase-11 é dispensável para a secreção de IL-1 β em resposta ao fungo <i>P. brasiliensis</i>	89
4.4. A liberação de IL-1 α no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados por <i>P. brasiliensis</i> depende da via não canônica de caspase-11	89
4.5. A síntese de IL-1 α , mediada por caspase-11, confere resistência ao hospedeiro durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	90
4.6. A liberação de IL-1 α durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i> previne a inflamação pulmonar.....	94
4.8. Caspase-8 contribui para a secreção de IL-1 β durante a infecção por <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	102
4.9. A deficiência de caspase-1/11 exacerba a maturação de caspase-8 durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	106

4.10. Caspase-8 promove o processamento de IL-1 β durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	111
4.11. O reconhecimento de <i>P. brasiliensis</i> por dectina-1, através da via não canônica de caspase-8, encarrega-se do processamento da IL-1 β	117
5. DISCUSSÃO	126
6. SUMÁRIO	145
7. CONCLUSÃO	147
8. MECANISMOS PROPOSTOS	149
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	151
10. ANEXOS	189
<i>Anexo 1: Sequência de primers</i>	<i>189</i>
<i>Anexo 2: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal</i>	<i>190</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A caspase-11, ativada durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i> , está relacionada com a formação de poro e liberação de LDH..	84
Figura 2. Caspase-11 é necessária para mediar a morte celular por piroptose e para induzir a produção de IL-1 α	88
Figura 3. Camundongos deficientes de IL-1 α são suscetíveis à infecção por <i>P. brasiliensis</i>	91
Figura 4. O fungo <i>P. brasiliensis</i> , em animais <i>Il1a</i> ^{-/-} , está localizado dentro de granulomas compactos, circundados por fibras de reticulina.	93
Figura 5. A IL-1 α acentua a presença de neutrófilos no pulmão de camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	96
Figura 6. A liberação de IL-1 α induzida pela via não canônica do inflamassoma de caspase-11 atenua a produção da citocina IL-17 desencadeada pela infecção por <i>P. brasiliensis</i>	97
Figura 7. O prejuízo no perfil de resposta Th17, observado em animais <i>Il1a</i> ^{-/-} infectados por <i>P. brasiliensis</i> , correlaciona com a menor produção de IL-6. ...	99
Figura 8. O clearance de <i>P. brasiliensis</i> , no pulmão de animais infectados, requer caspase-11.	101
Figura 9. A ausência de caspase-1 e/ou caspase-11 não é deletéria para a formação do granuloma durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	103
Figura 10. Caspase-8 é proteolicamente processada por células dendríticas durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	105
Figura 11. Caspase-8 é importante para o processamento e liberação de IL-1 β durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	107
Figura 12. <i>P. brasiliensis</i> ativa caspase-8 na ausência de caspase-1 e 11... ..	109
Figura 13. Caspase-8 é responsável pela secreção de IL-1 β que acontece de maneira independente do inflamassoma de caspase-1 e 11..	110
Figura 14. A falta da molécula adaptadora ASC aumenta a ativação da via não canônica de caspase-8 durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	112
Figura 15. Caspase-8 medeia a maturação de IL-1 β em resposta a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	113
Figura 16. A ativação eficiente da via canônica do inflamassoma de caspase-1 requer caspase-8	115

Figura 17. Na ausência de RIP3 e caspase-8, caspase-1 regula a liberação de IL-1 β induzida por <i>P. brasiliensis</i>	116
Figura 18. O reconhecimento de <i>P. brasiliensis</i> por dectina-1 induz a maturação de IL-1 β através da via não canônica de caspase-8.	119
Figura 19. A quinase Syk guia a produção de IL-1 β durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	121
Figura 20. O processamento da IL-1 β mediado pela quinase Syk está acoplado à ativação das caspases 8 e 1 durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	122
Figura 21. Caspase-8 compõe o speck de ASC montado após a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	124
Figura 22. <i>Crosstalking</i> entre caspases: integração entre as vias de sinalização do inflamassoma para mediar a resposta imune inata do hospedeiro contra <i>P. brasiliensis</i>	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD: do inglês, *7-aminoactinomicina*

AIM2: do inglês, *absent in melanoma 2*

APC: do inglês, *allophycocyanin*

ASC: do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*

ATP: do inglês, *adenosine triphosphate*

Bcl10: do inglês, *B-cell lymphoma/leukemia 10*

BHI: do inglês, *Brain Heart Infusion*

BIR: do inglês, *baculoviral inhibitory repeat-like domain*

BMDcs: células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea

BMDMs: Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea

BSA: do inglês, *bovine serum albumin*

CAPS: do inglês, *cryopyrin-associated periodic syndromes*

CARD: do inglês, *caspase recruitment domain*

CCL: ligante do receptor de quimiocina CCR

CCR: receptor de quimiocinas CC

CD: do inglês, *cluster of differentiation*

cDNA: do inglês, *complementary DNA*

cFLIP: do inglês, *cellular FLICE-inhibitory protein*

CFU: do inglês, *colony forming unit*

CXCL: ligante do receptor de quimiocina CXCR

CXCR: receptor de quimiocina CXC

DAB: do inglês, *diaminobenzidina*

DAF: do inglês, *fluorescein diacetate*

DED: do inglês, *death effector domain*

DEPC: do inglês, *dimetilpirocarbonato*

DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*

dpi: dias após a infecção

ELISA: do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*

ER: do inglês, *endoplasmatic reticulum*

EtBr: do inglês, *ethidium bromide*

FADD: do inglês, *FAS-associated death domain*

FcR γ : cadeia γ do receptor de Fc

FITC: do inglês, *fluorescein isothiocyanate*

FSC: do inglês, *forward- scatter cell*

G-CSF: do inglês, *granulocyte-colony stimulating factor*

GM-CSF: do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GSDMD: do inglês, *gasdermin D*

H&E: hematoxilina e eosina

ICAM-1: do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*

ICE: do inglês, *IL-1 β -converting enzyme*

IFN: *interferon*

IKK: do inglês, *I κ B kinase*

IL: interleucina

IL-1R: do inglês, *IL-1 receptor*

IL-1RAcP: do inglês, *interleukin-1 receptor accessory protein*

IRAK: do inglês, *interleukin-1 receptor-associated kinase 4*

LDH: lactato desidrogenase

LPS: do inglês, *lipopolysaccharide*

LRR: do inglês, *leucine-rich repeat*

Ly6G: do inglês, *lymphocyte antigen 6G*

MALT1: do inglês, *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*

MAPK: do inglês, *mitogen activated protein kinases*

mg: miligrama

MHC: do inglês, *major histocompatibility complex*

mL: mililitro

mM: milimolar

MOI: do inglês, *multiplicity of infection*

MyD88: do inglês, *myeloid differentiation primary response 88*

NADPH: do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NBD: do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*

NF- κ B: do inglês, *factor nuclear kappa B*

ng: nanograma

NLRs: do inglês, *Nod-like receptors*

nm: nanômetro

NO: do inglês, *nitric oxide*

PAMPs: do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*

PBMC: do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*

PBS: do inglês, *phosphate-buffered saline*

PCM: paracoccidioidomicose

PE: do inglês, *phycoerythrin*

pg: picograma

PI: do inglês, *propidium iodide*

PMA: do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PRRs: do inglês, *pattern recognition receptors*

PYD: do inglês, *pyrin domain*

qPCR: do inglês, *real time quantitative polymerase chain reaction*

RLU: do inglês, *relative light units*

RNA: do inglês, *ribonucleic acid*

SSC: do inglês, *side-scatter cell*

sTNF-RII: do inglês, *soluble TNF receptor type I*

Syk: do inglês, *spleen tyrosine kinase*

TAB: do inglês, *TGF-beta activated kinase*

TAK: do inglês, *fat-associated kinase*

TBS: do inglês, *tris-buffered saline*

TGF- β : do inglês, *transforming growth factor beta*

Th: do inglês *T helper*

TIR: do inglês, *Toll / IL1R domain*

TLRs: do inglês, *Toll-like receptors*

TMB: do inglês, *tetra-methyl-benzidine*

TNFR1: do inglês, *tumor necrosis factor receptor 1*

TNF- α : do inglês, *tumor necrosis factor alpha*

TRAF: do inglês, *TNF receptor-associated factor*

TRIF: do inglês, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon*

μ M: micromolar

UTR: do inglês, *untranslated region*

VE-caderina: do inglês, *vascular endothelial (VE)-cadherin*

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioidomicose: características gerais e epidemiologia*

Estima-se que cerca de 1,2 bilhões de pessoas no mundo sofrem de doenças fúngicas e que de 1,5 a 2 milhões de indivíduos morram anualmente por essa causa, superando a taxa de mortalidade por malária e tuberculose (BROWN *et al.*, 2012; VOS *et al.*, 2012). Na América Latina, a rica diversidade de biomassa e climas fornecem uma vasta gama de habitats para diferentes microrganismos, entre os quais encontram-se os fungos patogênicos responsáveis por micoses endêmicas como por exemplo a paracoccidioidomicose (COLOMBO *et al.*, 2011).

A paracoccidioidomicose (PCM), doença sistêmica, de evolução crônica e granulomatosa, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, é dentre as micoses sistêmicas aquela que apresenta a taxa de mortalidade mais elevada e a oitava causa de morte dentre as doenças crônicas, sejam elas infecciosas ou parasitárias (1,65/milhão de habitantes) (COUTINHO *et al.*, 2002; BOCCA *et al.*, 2013). Embora estenda-se do México a Argentina com uma distribuição não uniforme, devido a falta de registro de casos em países como Nicarágua, Guiana, Chile ou Suriname, a PCM é geograficamente restrita à América Central e à América do Sul (RESTREPO, 1985; RESTREPO *et al.*, 2001), isto é, à locais onde as condições ambientais favorecem a presença do fungo. Assim, a maioria dos casos ocorre em regiões de vegetação tropical ou subtropical, com solo ácido, temperaturas amenas e índice pluviométrico alto (RESTREPO, 1985; CALLE *et al.*, 2001; RESTREPO *et al.*, 2001; SIMOES *et al.*, 2004; LUPI *et al.*, 2005; BARROZO *et al.*, 2009; BARROZO *et al.*, 2010).

O Brasil, com incidência anual de novos casos variando de 1 a 3 para cada 100.000 habitantes (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006), soma aproximadamente 80% dos casos registrados na América Latina e seguido de Colômbia e Venezuela, é o país com maior prevalência da doença (BRUMMER *et al.*, 1993). Estudos demonstram que, no país, a positividade para o teste cutâneo com paracoccidioidina equivale a 60% dos indivíduos avaliados, sendo o número de infectados correspondente a 10% da população do país (COUTINHO *et al.*, 2002). Se essa estimativa estiver correta, a prevalência desta micose seria comparável à doença de Chagas na América Latina e superaria outras doenças negligenciadas como a esquistossomose e a leishmaniose (HOTEZ *et al.*, 2008).

Apesar de somente ser inserida recentemente na lista de doenças negligenciadas (HOTEZ *et al.*, 2008), essa micose é responsável por um grande número de invalidez e mortes nas faixas etárias adultas (MARTINEZ, 2010). A taxa média de mortalidade da PCM no país, a qual foi de 1,45 por 1.000.000 habitantes entre os anos de 1980 e 1995 (RESTREPO *et al.*, 2001; COUTINHO *et al.*, 2002) e de 0,9-1,0 entre 1996 a 2006 (PRADO *et al.*, 2009), torna-se significativamente elevada nas regiões Sul (2,59) e Centro-Oeste (2,35), seguidas, em ordem decrescente, por Sudeste (1,81), Norte (1,08) e Nordeste (0,20) (COUTINHO *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*, 2005).

Se levarmos em consideração os estados mais afetados tais como São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rondônia (BRUMMER *et al.*, 1993; ALMEIDA *et al.*, 2003; PANIAGO *et al.*, 2003; VERLI *et al.*, 2005), o número de óbitos é significativamente alto nos estados de Mato Grosso do Sul (4,39), Rondônia

(3,65), Paraná (3,52) e Mato Grosso (3,22) (COUTINHO *et al.*, 2002; BOCCA *et al.*, 2013). No estado de São Paulo ocorreram 1.950 óbitos por PCM no período de 1985 a 2005 (SANTO, 2008) e na cidade de Ribeirão Preto, onde a notificação de novos casos por ano chega a 40, a letalidade foi de 5% dos 215 casos atendidos entre 2000 e 2008 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/USP (MARTINEZ, 2010).

No entanto, mesmo com a ausência de notificação obrigatória, o que dificulta a quantificação precisa do impacto causado por essa doença na saúde pública brasileira (BARROZO *et al.*, 2009), sua importância como grande problema socioeconômico deriva-se não somente do fato de que o tratamento é prolongado, pouco acessível e de alto custo (MARTINEZ, 2010), mas também porque acomete trabalhadores rurais que ainda estão em seu período de vida produtivo (BLOTTA *et al.*, 1999; DEL NEGRO *et al.*, 2000; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006), gerando sequelas incapacitantes (FRANCO *et al.*, 1994). Portanto, por ter baixa visibilidade, devido às suas características epidemiológicas e clínicas e por acometer, principalmente, a população de baixa renda, que carece de recursos econômicos e não têm acesso adequado aos serviços de saúde (MARQUES *et al.*, 1983), as autoridades não dão a merecida atenção à essa micose. Com exceção de algumas medidas em alguns estados, não existem programas governamentais eficazes e permanentes que conscientizem a população sobre a prevenção e o diagnóstico, que forneçam antifúngicos e dêem assistência aos pacientes com complicações e sequelas (MARTINEZ, 2010).

1.2 Agente etiológico da paracoccidioidomicose

Historicamente, o primeiro relato da PCM foi feito em 1908 pelo médico e cientista Adolpho Lutz após isolar e descrever a presença de fungos dimórficos, distintos do *Coccidioides immitis*, nas lesões bucais de pacientes (MOREIRA, 2008). Depois, em 1912, Afonso Splendore classificou o agente etiológico da PCM como pertencente ao gênero *Zymonema* e propôs a denominação de *Zymonema brasiliensis* (LACAZ, 2002 - Tese Ana). A doença passou, então, a ser conhecida como blastomicose brasileira ou sul-americana, granulomatose blastomicóide neotropical, granuloma paracoccidióidico, adenomicose e doença de Lutz (LACAZ et al., 1991). No entanto, a classificação definitiva desse agente só foi realizada por Floriano Paulo de Almeida, em 1930, que confirmando os achados de Lutz, demonstrou as diferenças entre o granuloma coccidióico e paracoccidióico e incluiu no Reino *Fungi* o gênero *Paracoccidioides*, revalidando a espécie *brasiliensis* descoberta por Splendore (MOREIRA, 2008; LACAZ, 2002). Em 1971, na reunião de micologistas das Américas, em Medellín (Colômbia), o termo *paracoccidioidomicose* foi instituído, persistindo até hoje como nomenclatura oficial (VALLE; COSTA, 2001).

Conhecido por muitos anos como um fungo imperfeito pertencente ao filo *Deuteromycota* e a classe *Hyphomycetes*, pela falta de identificação de estruturas sexuais (SAN-BLAS et al., 2002), o gênero *Paracoccidioides*, atualmente, é classificado como um ascomiceto taxonomicamente incluso na classe *Plectomycetes*, na ordem *Onygnales* e na família *Onygenaceae* (renomeada como *Ajellomycetaceae*), juntamente com outros demais anamorfos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*,

Emmonsia parva, *Emmonsia crescens* e *Lacazia loboi* (LECLERC *et al.*, 1994; GUARRO *et al.*, 1999; BIALEK *et al.*, 2000; UNTEREINER *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2009). O gênero, por sua vez, é subdividido em duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, ambas causadoras da PCM (MATUTE *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2012; TEIXEIRA MDE *et al.*, 2014). A primeira delas não é uma espécie única e sim um complexo de espécies que compreende pelo menos quatro espécies crípticas decorrentes de dois eventos independentes de especiação: S1 (encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela), PS2 (Brasil e Venezuela), PS3 (restrito a Colômbia) e PS4 (descrito até o momento exclusivamente na Venezuela), todas caracterizadas por diferentes traços evolutivos e definidas com base na análise de oito *loci* gênicos contidos em cinco diferentes genes de 65 isolados de *P. brasiliensis* (MATUTE *et al.*, 2006; CARRERO *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2009; MARINI *et al.*, 2010; THEODORO *et al.*, 2012).

Como outros fungos termodimórficos, o *Paracoccidioides brasiliensis* é encontrado a temperatura ambiente de 19-28°C como micélio filamentoso composto por hifas septadas e como colônias de leveduras a 33-37°C (SAN-BLAS, 1985; 1993b). A fase leveduriforme é caracterizada, macroscopicamente, por colônias enrugadas, de coloração creme e crescimento lento (SIQUEIRA E LACAZ, 1991), enquanto que microscopicamente, as células multinucleadas e arredondadas possuem tamanho variável (4 a 40µm), parede celular refratária e dupla (com 200 a 600nm de espessura) e citoplasma contendo gotículas lipídicas (BRUMMER *et al.*, 1993; SAN-BLAS, 1993a; RESTREPO *et al.*, 2008). Uma peculiaridade marcante e que facilita sua identificação nessa fase é a aparência de "roda de

leme", como resultado do processo de divisão celular por brotamento laterais. Logo, uma célula-mãe é cercada por múltiplos blastoconídios (BRUMMER *et al.*, 1993). Por outro lado, as colônias micelianas são branco-amarronzadas, pequenas e irregulares, formadas por filamentos de células cilíndricas, com ramificações multinucleadas, finas e septadas, chamadas de hifas, as quais podem conter conídios (3,5 a 5 µm) terminais ou intercalares, propágulos fúngicos infectantes adaptados a condições inóspitas (CARBONELL, 1969; EDWARDS *et al.*, 1991; SAMSONOFF *et al.*, 1991; BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1993; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

A espécie *P. lutzii*, endêmica nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte do Brasil bem como no Equador (TEIXEIRA *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2012; TEIXEIRA MDE *et al.*, 2014), além de exibir conídios em forma de chapéu e de barril, comum à ambas, produz frequentemente conídios alongados, em forma de haste, os quais poderiam ser utilizados para determinação da espécie em testes diagnósticos (TEIXEIRA *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2012; TEIXEIRA MDE *et al.*, 2014). Já no que tange as células leveduriformes, nenhuma variação significativa é observada em relação ao tamanho e à forma, com exceção do isolado Pb01 de *P. lutzii*, que apresenta-se como leveduras maiores, e o PS2 de *P. brasiliensis* que comumente são alongadas, semelhantes à pseudohifas (TEIXEIRA *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2012).

As mudanças morfológicas que acontecem na transformação de levedura para micélio são acompanhadas pela alongação dos brotamentos da levedura, evento que permite o desenvolvimento da hifa (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1984; SAN-BLAS *et al.*, 2002), e por extensivas modificações na

composição da parede celular, não exclusivamente no que diz respeito a quantidade, mas também ao arranjo espacial das moléculas (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977). Nesse contexto, a medida que na parede celular miceliana há um predomínio de β -1,3 e β -1,6-glucanas, nas células leveduriformes as β -glucanas contribuem em apenas 5%. Nessa fase, 95% dos polímeros de glicose são do tipo α -1,3-glucanas (KANETSUNA *et al.*, 1972; PUCCIA *et al.*, 2011), o que assegura a sobrevivência do *P. brasiliensis* no interior do hospedeiro (TAVARES *et al.*, 2015) e auxilia na sua evasão da resposta imune (RAPPEYE *et al.*, 2007), visto que elas escondem as β -glucanas imunoestimuladoras do reconhecimento pelas células fagocíticas (KLEIN e TEBBETS, 2007). Ademais, diversas evidências têm demonstrado que o nível de virulência de *P. brasiliensis* é proporcional ao conteúdo de α -glucana, de tal maneira que isolados altamente virulentos chegam a ter 40% do peso total de sua parede celular formada por esse polissacarídeo, enquanto que os de baixa virulência possuem de 3 a 5% (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977; HALLAK *et al.*, 1982; HOGAN e KLEIN, 1994).

Na literatura, existem poucos dados sobre qual seria o nicho ecológico do fungo *P. brasiliensis* na natureza (RESTREPO, 1985). Contudo, aceita-se que ele viva saprofiticamente em solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com pequenas alterações de temperatura (RESTREPO, 1985; SOUTO *et al.*, 2000; RESTREPO *et al.*, 2001; SIMOES *et al.*, 2004; BARROZO *et al.*, 2009). Vale ressaltar, todavia, que somente esporadicamente esse fungo foi isolado a partir de diferentes fontes (NEGRONI, 1966; DE ALBORNOZ, 1971; VERGARA e MARTINEZ, 1998), devido a dificuldade de rastreabilidade do fungo no ambiente e pela pouca repetibilidade nas tentativas de isolamento (FRANCO *et*

al., 2000). Mesmo assim, o trabalho em áreas rurais, que necessite a manipulação do solo, ainda é um fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (FRANCO *et al.*, 2000), razão pela qual a maioria dos pacientes com micose ativa sejam indivíduos que exercem ou exerceram atividades agrícolas (LACAZ, 1991).

A infecção do hospedeiro humano ocorre mais comumente pela via respiratória, quando propágulos aéreos do fungo, presentes no ambiente, alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares (RESTREPO *et al.*, 1986; DOMER *et al.*, 1992). Neste momento, a forma micelial sofre conversão para a de levedura, intracelular facultativa, como reflexo de um efeito adaptativo do microrganismo (DA SILVA *et al.*, 1994), uma vez que essa forma é capaz de sobreviver por longos períodos no tecido do hospedeiro mamífero. A princípio, acreditava-se que o homem era o único hospedeiro infectado pelo *P. brasiliensis*, em virtude da falta de evidências clínicas da doença em outros animais, cujo isolamento do fungo já havia sido evidenciado (BAGAGLI *et al.*, 1998). Entretanto, com a identificação da lesão granulomatosa, indicativo de doença ativa, em diferentes órgãos coletados do tatu de nove-faixas (*Dasypus novemcinctus*), no Brasil (NAIFF *et al.*, 1986; VERGARA e MARTINEZ, 1998; BAGAGLI *et al.*, 2003; HEBELER-BARBOSA, MONTENEGRO, *et al.*, 2003; HEBELER-BARBOSA, MORAIS, *et al.*, 2003) e do tatu-de-rabo-mole (*Cabassous centralis*), na Colômbia, sugere-se que esses silvestres além de serem reservatórios naturais também sejam possíveis hospedeiros intermediários para o *P. brasiliensis* (RESTREPO *et al.*, 2001).

Por possuírem temperatura corporal ideal, entre 32,7 e 35,3°C, baixa resposta imunológica e constante contato com *P. brasiliensis* no solo, os tatus

são hospedeiros atraentes e, por isso, podem ter desempenhado um papel crítico na evolução do fungo frente às condições zoofílicas (THEODORO *et al.*, 2005; BAGAGLI *et al.*, 2006). Alternativamente, há relatos de *P. brasiliensis* em guaxinins, cobaias, porcos-espinhos, furões e iraras (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; ALBANO *et al.*, 2014), cães (RICCI *et al.*, 2004; FONTANA *et al.*, 2010; DE FARIAS *et al.*, 2011), suínos (BELITARDO, CALEFI, BORGES, *et al.*, 2014), coelhos (BELITARDO, CALEFI, SBEGHEN, *et al.*, 2014), gatos (OLIVEIRA *et al.*, 2013), cabras (FERREIRA *et al.*, 2013), ovinos (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e galinhas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Mais estudos conclusivos, porém, são necessários para elucidar o papel definitivo que esses animais desempenham no ciclo de vida natural do agente etiológico da PCM (BAGAGLI *et al.*, 2006).

1.3 Manifestações clínicas da paracoccidioidomicose

Aproximadamente 10 milhões de pessoas na América Latina estão infectadas por *P. brasiliensis*, das quais apenas uma minoria, cerca de 1 a 2%, irá desenvolver a doença (ANDRADE *et al.*, 2005; BENARD, 2008). Alguns indivíduos desenvolvem uma infecção pulmonar assintomática, localizada e benigna, enquanto outros podem apresentar diversas manifestações clínicas, as quais podem dar origem a distintas formas da PCM e evoluir de uma maneira disseminada, progressiva ou até mesmo fatal (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; RAMOS e SARAIVA LDO, 2008).

As manifestações clínicas da doença podem ser provenientes de uma infecção primária, da reativação de focos quiescentes após um período de latência (reativação endógena) ou de uma reinfecção exógena, após prévia

exposição ao agente infeccioso (MONTENEGRO; FRANCO, 1994). Uma vez estabelecida, dependendo dos fatores relacionados ao hospedeiro e ao fungo, a PCM pode regredir, com destruição e eliminação das leveduras, ou progredir, com a formação de focos quiescentes e latentes (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977; ROBLEDO *et al.*, 1982). Além disso, pode evoluir para um pior prognóstico, como resultado da proliferação e disseminação do fungo. Como consequência ocorre a formação de lesões ativas que são agrupadas em dois tipos: forma aguda ou subaguda e forma crônica (FRANCO, 1987). A forma aguda/subaguda da micose representa uma continuação da infecção inicial, enquanto que a forma crônica seria decorrente da reativação de focos quiescentes do fungo (BENARD, 2008).

A forma aguda ou subaguda da PCM, também conhecida como tipo juvenil, é o tipo menos frequente, representando de 3 a 5% dos casos, e é definida por sua evolução rápida e por lesões disseminadas. Afeta, principalmente, indivíduos de ambos os sexos, entre 3 e 30 anos de idade (RESTREPO-MORENO, 2003). Neste caso, a ineficácia da resposta imune celular permite a grande proliferação do fungo, com necrose e supuração das lesões, e a ampliação progressiva de úlceras cutâneas e de mucosas. O acometimento pulmonar é raro e ocorre em apenas 5-11% dos pacientes (FRANCO *et al.*, 1987; MENDES, 1994; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A forma crônica ou tipo adulto, manifesta-se em mais de 90% dos casos, prevalece em homens com idade de 30 a 60 anos (RESTREPO-MORENO, 2003) e pode conter lesões unifocais ou multifocais, dependendo do envolvimento de um ou mais órgãos, respectivamente. O pulmão é o órgão mais comumente comprometido, seguido pelo aparecimento de ulcerações na

pele e na mucosa orofaríngea (MOREJON *et al.*, 2009). Entretanto, lesões secundárias também podem acontecer no baço, nas glândulas adrenais, na medula, nos olhos, no cérebro e no sistema genitourinário (BOCCA *et al.*, 2013).

A medida que a forma aguda ou subaguda da PCM resulta em uma taxa de mortalidade significativa, a forma crônica conduz a uma considerável morbidade (BRUMMER *et al.*, 1993) em razão da insuficiência pulmonar ocasionada pela fibrose e constatada em 32% dos indivíduos (TOBON *et al.*, 2003; SIMOES *et al.*, 2004; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A fibrose pulmonar, sequela que altera drasticamente as funções respiratórias do paciente, incapacitando-o de desenvolver suas atividades diárias (TOBON *et al.*, 2003), aparece, concomitantemente, ao processo inflamatório, desencadeado pela infecção progressiva e persistente, e consolida-se com o surgimento do granuloma (KERR, ARARIPE, *et al.*, 1988; KERR, DE OLIVEIRA, *et al.*, 1988; FRANCO *et al.*, 1998), típica resposta imune celular, a qual é específica para componentes do fungo *P. brasiliensis* (FORTES *et al.*, 2011). Contudo, o granuloma, aspecto patológico clássico da PCM, funciona tanto como um nicho, no qual o fungo pode crescer ou persistir, como um microambiente imunológico em que as células com atividade antifúngica interagem para controlar e prevenir a disseminação da infecção (ROBLEDO *et al.*, 1982).

Apesar dos mecanismos relacionados com a permanência de *P. brasiliensis* em forma quiescente no tecido do hospedeiro não serem conhecidos, é possível que os granulomas representem um reservatório de leveduras viáveis. Paradoxalmente, a ausência de granulomas compactos está

associada com doença grave e disseminada, já que pacientes com resposta imune celular inadequada, apresentam granulomas frouxos e um elevado número de leveduras viáveis nas lesões (BRUMMER *et al.*, 1993; BENARD *et al.*, 1997; SOUTO *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2006).

Assim, a resposta imune protetora contra o fungo *P. brasiliensis*, além de contar com um eficiente recrutamento celular, também é dependente do estado de organização e ativação dessas células no sítio de infecção, haja visto que o fato do hospedeiro ser capaz de formar granulomas não garante sua funcionalidade. No entanto, a principal lacuna na compreensão da PCM é estabelecer quais os mecanismos que levam à um "granuloma funcional", ou seja, que consiga eliminar ou limitar a infecção a longo prazo. Assume-se que, provavelmente, existam diferenças entre indivíduos distintos e entre granulomas de um mesmo indivíduo (CALICH e KASHINO, 1998; KAMINAGAKURA *et al.*, 2007), mas que uma combinação de fatores contribua, dentre eles, o tipo de resposta imune desencadeado.

1.4. Relação parasito-hospedeiro na infecção por *P. brasiliensis*

O estabelecimento da PCM bem como sua disseminação dependem da dinâmica e complexa interação fungo-célula, na qual fatores inerentes ao fungo, como virulência e composição antigênica, desempenham um papel relevante na tentativa de garantir a sobrevivência do agente infeccioso dentro do hospedeiro (SAN-BLAS, 1993b; FORTES *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Entretanto, o prognóstico da doença, além de estar diretamente relacionado as propriedades do agente infeccioso, as quais favorecem sua persistência, também é determinado pelos mecanismos de defesa do

hospedeiro, que modulam a resposta imunológica contra o fungo (FRANCO, 1987; SILVA *et al.*, 2008). Dessa forma, pacientes com imunidade mais eficiente em eliminar o *P. brasiliensis*, geralmente, possuem doença menos grave, com lesões localizadas, caracterizadas pela tendência à formação de granulomas epitelióides bem definidos, menor número de fungos e menos sequelas fibróticas (FRANCO *et al.*, 1993).

Nesse sentido, enquanto pacientes curados da PCM ou que foram infectados, porém permanecem assintomáticos, secretam grande quantidade de IL-12 e pouca IL-10 (MARQUES MELLO *et al.*, 2002; PERACOLI *et al.*, 2003; PARISE-FORTES *et al.*, 2006; BENARD, 2008), pacientes com doença ativa exibem um aumento nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 e uma diminuição de IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ (BAVA *et al.*, 1991; TAPIA *et al.*, 1991; BENARD *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002; ROMANO *et al.*, 2002; CALVI *et al.*, 2003; PARISE-FORTES *et al.*, 2006; BENARD, 2008), sendo que no caso da forma crônica, por exemplo, a produção de IFN- γ é maior em indivíduos com lesões localizadas do que naqueles em que a doença manifesta-se em múltiplos órgãos (MARQUES *et al.*, 2005). Portanto, a resolução da infecção, assim como o desenvolvimento de formas brandas e assintomáticas da doença, envolve a produção de citocinas do padrão T *helper* (Th) 1, como IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ e TNF- α , ao passo que o predomínio da resposta Th2, com a síntese de IL-4, IL-5 e IL-10, colabora para a presença de doença grave e disseminada (CALICH e KASHINO, 1998; CANO *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002; PERACOLI *et al.*, 2003; LIVONESI *et al.*, 2008; RAMOS e SARAIVA LDO, 2008).

Trabalhos com animais de experimentação reforçam os achados em humanos e enfatizam a participação do IFN- γ na proteção do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis*, haja visto que a resistência em camundongos está similarmente associada com a resposta imunológica do tipo Th1 (KASHINO *et al.*, 2000) e que a depleção de IFN- γ em animais resistentes, através do uso de anticorpo monoclonal, exacerba a inflamação pulmonar (CANO *et al.*, 1998). Ademais, como essa citocina controla a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, tais como CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10 e ICAM-1, o que favorece a migração de leucócitos para o pulmão e, conseqüentemente, influencia na formação e manutenção dos granulomas (SOUTO *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2006), a rápida mortalidade, resultante da deficiência genética de IFN- γ , é derivada da infecção disseminada precoce, provocada pela presença de granulomas frouxos (CANO *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000). Deve-se salientar inclusive que o IFN- γ ativa macrófagos, os quais passam a produzir óxido nítrico (NO), metabólito importante para que essa célula exerça sua atividade fungicida (GONZALEZ *et al.*, 2000; NATHAN e SHILOH, 2000) e para que a transição conídio-levedura, durante a infecção por *P. brasiliensis*, seja inibida (GONZALEZ *et al.*, 2000). Todavia, é possível que o NO também seja a causa da imunossupressão observada ao longo da doença (BOCCA *et al.*, 1998; LIVONESI *et al.*, 2009), uma vez que reduz tanto a expressão de moléculas de MHC de classe II como a resposta proliferativa de células do baço (KURITA *et al.*, 2000; LIVONESI *et al.*, 2009) e inibe a produção de TNF- α (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1994), citocina importante para a permanência de granulomas bem formados (CISALPINO *et al.*, 1996).

O TNF- α , produzido por macrófagos infectados, além de induzir uma atividade antifúngica mais eficaz do que o IFN- γ (SOARES *et al.*, 2001), garante também a capacidade de *killing* dessa célula após ativação com IFN- γ (CALVI *et al.*, 2003), de maneira a amplificar a resposta imune do hospedeiro e a promover a reação granulomatosa (SOUTO *et al.*, 2000). Ademais, na PCM, orchestra o tráfico de leucócitos, estimulando a produção de moléculas de adesão, bem como ativa fibroblastos, com o intuito de manter a formação de granulomas compactos (PARISE-FORTES *et al.*, 2006; CALVI *et al.*, 2003). A importância do TNF- α na formação de granulomas também foi validada em humanos. Por meio do uso de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com PCM, Diniz *et al.*, 2001 revelaram que a formação *in vitro* do granuloma, em resposta a diferentes frações antigênicas de *P. brasiliensis*, era proporcional a produção dessa citocina. Além disso, é descrito que em pacientes com a forma aguda da doença, o elevado nível sérico do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-RII) está associado com a gravidade, enquanto que em pacientes com a forma crônica, é indicativo de doença ativa (CORVINO *et al.*, 2007; LYON *et al.*, 2009).

Embora a resposta imune pró-inflamatória, com secreção inicial de TNF- α , IL-12 e produção sustentada de IFN- γ , seja essencial para a defesa do hospedeiro, o balanço entre sinais pró e anti-inflamatórios é imprescindível para o sucesso da interação fungo-célula, posto que a exacerbação da resposta imunológica, aliada a falta de regulação, acarreta em dano tecidual (CALICH e KASHINO, 1998). Desse modo, durante o curso da infecção, a síntese de IL-10 e TGF- β , como consequência do estímulo prolongado, presumivelmente, tem a função de controlar e modular a reação inflamatória

em pacientes com doença ativa (KUROKAWA *et al.*, 2007). Porém, em contrapartida, com a supressão da resposta imune local, os granulomas são incapazes de conter o crescimento do fungo e isso contribui para a suscetibilidade à doença, visto que o fungo beneficia-se desse mecanismo para evadir a resposta imunológica do hospedeiro (NEWORAL *et al.*, 2003).

De fato, as citocinas IL-10 e TGF- β , produzidas por PBMC de pacientes infectados (MAMONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAMONI e BLOTTA, 2005; PARISE-FORTES *et al.*, 2006) e encontradas nas lesões cutâneas e de mucosa (NEWORAL *et al.*, 2003; PAGLIARI e SOTTO, 2003), inibem a atividade fungicida de macrófagos, suprimindo a produção de intermediários reativos de nitrogênio e H₂O₂. Contudo, o TGF- β também está implicado nos processos de fibrose e reparo tecidual (NISHIKAKU e BURGER, 2003) e, juntamente com IL-6, IL-1 β e IL-21, induz a diferenciação de linfócitos T CD4+ em um subtipo, denominado Th17, produtor de IL-17 (A ou F), IL-21 e IL-22 (KORN *et al.*, 2009), que é crucial para as respostas antifúngicas (CONTI *et al.*, 2009; PAGLIARI *et al.*, 2011; PANDIYAN *et al.*, 2011; HERNANDEZ-SANTOS e GAFFEN, 2012; HERNANDEZ-SANTOS *et al.*, 2013; MURDOCK *et al.*, 2014).

Na PCM sabe-se que a infecção por *P. brasiliensis* desencadeia a produção de IL-6 em células epiteliais pulmonares (MAZA *et al.*, 2012) e em monócitos de indivíduos saudáveis, sendo sua dosagem proporcional à virulência da cepa escolhida (KUROKAWA *et al.*, 2007) e independente de estimulação se as células mononucleares forem provenientes de pacientes (PERACOLI *et al.*, 2003). Adicionalmente, a população de células expressando IL-17 compõe o infiltrado inflamatório de biópsias de pele e de mucosa de

pacientes com PCM, encontrando-se uniformemente distribuída dentro das lesões granulomatosas (PAGLIARI *et al.*, 2011), e a hipersecreção de IL-17, no pulmão de camundongos infectados com conídios de *P. brasiliensis*, duas horas após a infecção, estende-se até a 4ª semana (LOPERA *et al.*, 2011). Mas, até o momento, o efeito IL-17 na evolução da PCM ainda não foi elucidado. Dados não publicados do nosso laboratório, revelam que a deficiência do receptor de IL-17 confere suscetibilidade à infecção devido a queda na produção de TNF- α e IFN- γ e ao comprometimento da resposta granulomatosa (TRISTÃO *et al.*, em preparação).

O principal mecanismo da imunidade mediada por IL-17 é a ativação indireta de neutrófilos (HUANG *et al.*, 2004; ZELANTE *et al.*, 2007; CONTI *et al.*, 2009; VAN DE VEERDONK *et al.*, 2010). Os sinais desencadeados pela sinalização dessa citocina, em células epiteliais ou mesenquimais, levam à expressão de G-CSF e de quimiocinas CXC, como CXCL1/KC; CXCL2/MIP2, CXCL8/IL-8, que, em conjunto, direcionam o recrutamento e a expansão dos neutrófilos (YE *et al.*, 2001; KOLLS e LINDEN, 2004; ZELANTE *et al.*, 2007; YU e GAFFEN, 2008; KHADER *et al.*, 2009). Estudos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostram que os neutrófilos podem tanto se unir para formar uma espécie de vacúolo extracelular que engloba as leveduras de *P. brasiliensis* de maior tamanho como podem ingerir o fungo por meio de um processo de fagocitose típico, que envolve a emissão de pseudópodes (DIAS *et al.*, 2004). Entretanto, de acordo com trabalhos de Gohman-Yahr e colaboradores (GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1980; GOIHMAN-YAHR, CABELLO DE BRITO, *et al.*, 1989; GOIHMAN-YAHR, ROTHENBERG, *et al.*, 1989; GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1990; GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1992) existe, em alguns

indivíduos, uma inabilidade intrínseca dos neutrófilos fagocitarem o fungo *P. brasiliensis*, o que ocasiona em predisposição à doença mesmo sem imunodeficiências comprovadas e indica um papel relevante dessas células na resistência à PCM. A ligação do fungo à membrana da célula impulsiona a ativação da enzima NADPH oxidase (DIAS *et al.*, 2008) e a liberação de intermediários do oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos (RODRIGUES *et al.*, 2007), os quais são importantes para combater a infecção. No entanto, neutrófilos não ativados falham em exibir atividade antifúngica, função que é potencializada por citocinas, como IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15 (KURITA *et al.*, 1999; KURITA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2007; TAVIAN *et al.*, 2008). Em adição às suas funções de fagocitose e *killing*, os neutrófilos modulam também a resposta imunológica, secretando citocinas (BALDERRAMAS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014), e participam da formação da resposta granulomatosa, haja visto que em amostras de cavidade oral de pacientes com PCM, ocorre um acúmulo maciço de polimorfonucleares em microabscessos, os quais estão presentes em granulomas frouxos, mas ausentes em granulomas bem formados (ARAUJO *et al.*, 2013).

1.5. O granuloma paracoccidióidico

Uma das diferenças mais notáveis entre as lesões crônicas de animais resistentes e suscetíveis a infecção por *P. brasiliensis* é a abundância inicial de neutrófilos em áreas de extensa destruição fúngica, associada à menor recuperação de leveduras viáveis, fenótipo que é revertido após a depleção neutrofílica (PINA *et al.*, 2006). Embora as características histopatológicas

iniciais da PCM em humanos ainda não sejam compreendidas completamente, alguns estudos com modelos experimentais têm demonstrado que macrófagos alveolares residentes, em contato com *P. brasiliensis*, iniciam a neutrofilia extravascular pela liberação de peptídeos quimiotáticos (CALICH *et al.*, 1985), visto que a ampla infiltração de polimorfonucleares no pulmão, na fase aguda da infecção experimental com *P. brasiliensis*, foi correlacionada com a liberação de quimioatraentes (SOUTO *et al.*, 2003). Dessa maneira, a reação inflamatória granulomatosa do tipo congestiva-exsudativa, disparada pelo contato com o fungo *P. brasiliensis*, é um processo dinâmico, no qual a população de células infiltradas no local varia conforme o período de infecção analisado (FRANCO *et al.*, 1993), podendo ser cineticamente dividida em três estágios.

A primeira fase, conhecida como *monocítica-neutrofílica* inicia-se com o influxo, predominantemente, de neutrófilos, que, em microabscessos bem delimitados, secretam citocinas e quimiocinas importantes para o recrutamento de monócitos, os quais, por sua vez, na etapa seguinte (*fase pré-granulomatosa*), já diferenciados em macrófagos, podem fusionar-se, para dar origem às células gigantes multinucleadas, ou transformar-se em células epitelióides (também nomeadas como histiócitos epitelióides). Após a substituição dos neutrófilos por macrófagos, que, nesse momento, passam a envolver a zona supurativa central, para englobar os restos do microrganismo, ocorre o acúmulo de linfócitos, assinalando a *fase granulomatosa*, último passo para a formação do granuloma propriamente dito (KERR, ARARIPE, *et al.*, 1988; FRANCO *et al.*, 1993; DE BRITO e FRANCO, 1994; COCK *et al.*, 2000; HELMING e GORDON, 2007; KAMINAGAKURA *et al.*, 2007).

Por conseguinte, o granuloma paracoccidióidico é caracterizado como um nódulo epitelial com áreas necróticas centrais circundadas por agregados de leucócitos polimorfonucleares, os quais, juntamente com um halo monocítico/linfocitário periférico, são recobertos por uma densa camada de tecido conjuntivo (IABUKI e MONTENEGRO, 1979; DE BRITO e FRANCO, 1994; DE CAMARGO e DE FRANCO, 2000), que, gradualmente, é preenchido por uma intensidade variável de tecido cicatricial fibrótico (COCK *et al.*, 2000; DE CAMARGO e DE FRANCO, 2000). Por conta dessa distribuição, o granuloma organiza-se em duas zonas: *central* e *periférica*. A zona central é subdividida em *afibrilar*, área na qual se localizam os macrófagos, células epitelíoides, células gigantes bem como os linfócitos, e uma outra camada mais externa denominada *fibrilar*, composto por filbrilas de colágeno, principalmente do tipo I, que irradiam randomicamente para a zona periférica, rica em fibroblastos e matriz extracelular. Já na zona periférica, capsular e fibrótica, ocorre a deposição concêntrica de colágeno tipo I, o qual arranja-se em feixes compactos e entrelaça-se com finas fibras reticulares de colágeno tipo III e proteoglicanas sulfatadas (KERR, ARARIPE, *et al.*, 1988; COCK *et al.*, 2000).

Embora o granuloma na paracoccidioidomicose seja povoado por uma variedade de células (KERR, ARARIPE, *et al.*, 1988; DEFAVERI *et al.*, 1989), o principal componente celular dessa estrutura é o macrófago, que, devido a sua posição privilegiada, é o primeiro a interagir com o fungo e a exercer suas funções efectoras, na tentativa de defender o hospedeiro do agente invasor (BENARD, 2008; LOURES *et al.*, 2009). De fato, sua habilidade de *killing* e de fagocitose, em conjunto com a secreção de citocinas, tais como TNF- α , IL-12, IL-1 β e IL-18, são passos decisivos para direcionar os eventos subsequentes

da imunidade anti-*P. brasiliensis* (FRANCO, 1987). Por isso, durante o curso da infecção, os macrófagos podem tanto promover a disseminação do fungo *P. brasiliensis* como possibilitar a sua restrição. Em ambos os casos, o balanço de citocinas desempenha um papel essencial nessa "decisão", visto que a ativação adequada desse subtipo celular faz-se necessária para aumentar suas propriedades fungicidas (BENARD, 2008).

1.6. Resposta imune inata contra *P. brasiliensis*: receptores do tipo Toll

O desenvolvimento de uma resposta adequada e específica durante a PCM não se restringe a imunidade adaptativa e requer a participação dos diversos componentes do sistema imune inato. Através do reconhecimento de padrões moleculares presentes em patógenos (PAMPs), o sistema imune inato direciona e potencializa a resposta adaptativa (KUMAR *et al.*, 2011) bem como alerta o hospedeiro sobre o perigo de uma infecção. O reconhecimento de PAMPs pelas células da imunidade inata como, por exemplo, macrófagos e células dendríticas, é mediado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais são codificados pela linhagem germinativa e estão envolvidos na detecção de estruturas altamente conservadas entre os patógenos e indispensáveis para sua sobrevivência, tais como RNA de fita simples, lipopolissacarídeo (LPS), peptideoglicano, entre outros (MEDZHITOV, 2001).

Os receptores do tipo *Toll-like* (TLRs), uma das classes mais estudadas de PRRs, foram definidos inicialmente, em mamíferos, através de análise de dados, como homólogos do gene *Toll*, o qual já havia sido caracterizado, em insetos frutíferos da espécie *Drosophila melanogaster*, como um gene essencial na ontogênese e na resistência antimicrobiana (LEMAITRE *et al.*,

1996; MEDZHITOV *et al.*, 1997; MEDZHITOV, 2001; HOFFMANN e REICHHART, 2002; AKIRA, 2003). Em camundongos e humanos são identificados 10 e 12 TLRs, respectivamente, sendo que os TLRs de 1 a 9 são conservados em ambas as espécies (TAKEDA *et al.*, 2003; YAROVINSKY *et al.*, 2005; AKIRA *et al.*, 2006; MISHRA *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2009; GUAN *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2010). A análise comparativa da sequência de aminoácidos e da estrutura genômica dos TLRs humanos mostrou que os membros dessa família podem ser divididos em 5 subfamílias (TLR3, TLR4, TLR5, TLR2 and TLR9). Na subfamília do TLR2, composta por TLR1, 2, 6 e 10, o TLR1 e o TLR6 exibem 69,3% de identidade na sequência global de aminoácidos (TAKEUCHI, KAWAI, *et al.*, 1999) e um éxon localizado em tandem no mesmo cromossomo, diferindo do gene do TLR2, que tem dois éxons, com a sequência codificadora contida somente dentro de um deles (o éxon 2). Em contraposição, os membros da subfamília TLR9, na qual estão TLR7, 8 e 9, são codificados por dois éxons (CHUANG e ULEVITCH, 2000; DU *et al.*, 2000), sendo que os genes do TLR7 e TLR8 possuem 42,3% de identidade, 72,7% de similaridade na sequência de aminoácidos e estão próximos um do outro no genoma (CHUANG e ULEVITCH, 2000; DU *et al.*, 2000). Os genes para o TLR4 e TLR5 / TLR3 possuem, respectivamente, 4 e 5 éxons, respectivamente, sendo que o TLR3, é o único em que a proteína é traduzida a partir de 4 dos 5 éxons (MEDZHITOV, 2001).

Os TLRs estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra diferentes fungos. Estudos *in vivo* e *in vitro* destacam que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (NETEA *et al.*, 2002; MEIER *et al.*, 2003; BELLOCCHIO *et al.*, 2004; YAUCH *et al.*, 2004; BIONDO *et al.*, 2005;

DUBOURDEAU *et al.*, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2006) podem sinalizar através de membros da classe dos TLRs, especialmente TLR2 e TLR4. Embora o TLR4 funcione como o receptor que transduz sinal após a ligação ao LPS (POLTORAK *et al.*, 1998; HOSHINO *et al.*, 1999; QURESHI *et al.*, 1999), e o TLR2 esteja envolvido com o reconhecimento de uma variedade de produtos microbianos, dentre eles peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas (YANG *et al.*, 1998; ALIPRANTIS *et al.*, 1999; BRIGHTBILL *et al.*, 1999; SCHWANDNER *et al.*, 1999; TAKEUCHI, HOSHINO, *et al.*, 1999; TAKEUCHI *et al.*, 2000), além de componentes da parede celular de fungos (UNDERHILL *et al.*, 1999), é relatado que fosfolipomananas derivadas de *C. albicans* podem ser percebidas por TLR2 (JOUAULT *et al.*, 2003) enquanto mananas O-ligadas são reconhecidas por TLR4 (NETEA *et al.*, 2006).

Estudos experimentais que investigam o papel desses receptores na PCM, revelam que as leveduras de *P. brasiliensis* utilizam TLR2 e TLR4 para infectar os macrófagos do hospedeiro, mecanismo que garante sua sobrevivência e multiplicação dentro das células fagocíticas (CALICH *et al.*, 2008) e explica o motivo da menor contagem de fungos no pulmão de animais *Tlr2*^{-/-} e *Tlr4*^{-/-}. A diminuição na recuperação fúngica, observada na linhagem murina C3H/HeJ, que possui uma mutação no gene TLR4, e em camundongos *Tlr4*^{-/-} e *Tlr2*^{-/-} não está associada com a maior ativação e capacidade de *killing* dos macrófagos, mas sim relacionada à menor fagocitose de leveduras, visto que o número de leveduras ingeridas encontrava-se reduzido (CALICH *et al.*, 1985; LOURES *et al.*, 2009; LOURES *et al.*, 2010). Além disso, sugere-se que TLR2 e TLR4 estão envolvidos no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis* por monócitos e neutrófilos humanos, indicando um papel crucial

desses receptores na resposta imune contra esse fungo (BONFIM *et al.*, 2009). Embora LPS ou seus componentes não tenham sido caracterizados na parede celular do fungo *P. brasiliensis*, supõe-se que a elevada proporção de galactomanana, na fração alcalina solúvel, possa desempenhar um importante papel na ativação do receptor TLR4 (KANETSUNA *et al.*, 1969).

A cascata de sinalização intracelular, disparada pelo reconhecimento do ligante, inicia-se, após a mudança conformacional induzida pela dimerização do receptor, com o recrutamento das moléculas adaptadoras MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) ou TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon*) (DUNNE e O'NEILL, 2003; TAKEDA *et al.*, 2003). Na via clássica de ativação, MyD88 facilita, a associação da molécula IRAK4 ao complexo, a qual por sua vez, fosforila os resíduos de ativação presente em IRAK1, permitindo, assim, a ligação a TRAF6. Em seguida, o complexo IRAK1-TRAF6 desprende-se do receptor e interage na membrana plasmática com outro complexo já pré-formado, o qual é composto por TAK1, TAB1 e TAB2/TAB3. Essa interação induz a fosforilação de TAB2/TAB3 e TAK1, que, juntamente com TRAF6 e TAB1 translocam para o citoplasma, onde TAK1 ativa tanto MAPK (*mitogen activated protein kinases*) como IKK (*I κ B kinase*). A quinase IKK, por fim, fosforila o inibidor de NF- κ B, denominado I κ B, liberando o fator de transcrição NF- κ B do seu estado inativo para que ele possa desencadear, no núcleo, a expressão de citocinas pró inflamatórias, tais como IL-1- β , TNF- α , IL-6 e IL-12 (ADACHI *et al.*, 1998; AKIRA e TAKEDA, 2004; O'NEILL e BOWIE, 2007; CALICH *et al.*, 2008; CASANOVA *et al.*, 2011). Recentemente, o grupo de Calich verificou, em macrófagos peritoneais, que a ausência da sinalização via MyD88 reduz a habilidade fungicida dessas células

como consequência dos baixos níveis de NO. Em conformidade com esses dados, camundongos *Myd88*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* apresentaram elevada carga fúngica pulmonar, lesões granulomatosas não organizadas e coalescentes, alta taxa de mortalidade além de respostas Th1 e Th17 debilitadas (LOURES *et al.*, 2011).

1.7. Membros da família do receptor de IL-1 e seus ligantes

Localizados na superfície celular e nos endossomos, os TLRs foram preditos como um grupo de glicoproteínas integrais de membrana que possuem um domínio extracelular rico em leucina (LRR) acoplado, por um segmento transmembrana, à uma região conservada, de aproximadamente 200 aminoácidos, contida na porção citoplasmática e conhecida como domínio TIR (*Toll / IL1R domain*) (SLACK *et al.*, 2000), o qual é semelhante ao domínio de sinalização utilizado pelo do receptor de IL-1 (IL-1R) (GAY e KEITH, 1991; O'NEILL, 2000; O'NEILL e BOWIE, 2007; O'NEILL, 2008). A família do IL-1R tem 10 membros em humanos e camundongos, sendo que apenas um deles não possui o domínio TIR (IL-1RII). Nos demais, estão inclusos dois correceptores (IL-1RAcP and IL-18R β), um receptor inibitório (TIR8/SIGIRR) e seis receptores (IL-1R1, IL-18R α , IL-33R α , TIGIRR-1, TIGIRR-2, and IL-1Rrp2), (AREND *et al.*, 2008; DINARELLO, 2009; SIMS e SMITH, 2010), entre os quais estão aqueles que respondem à três potentes citocinas pró-inflamatórias pertencente à família da IL-1: IL-1 α/β (IL-1R1 e IL-1RAcP) (AREND *et al.*, 2008; DINARELLO, 2009; SIMS e SMITH, 2010), IL-18 (IL-18R α e IL-18R β) (NAKANISHI *et al.*, 2001; TSUTSUI *et al.*, 2004; AREND *et al.*, 2008) e IL-33

(IL-33R α e IL-1RAcP) (CARRIE *et al.*, 1999; AREND *et al.*, 2008; HARALDSEN *et al.*, 2009).

As citocinas, pertencentes a família da IL-1, compreendem sete moléculas com atividade agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36a, IL-36b e IL-36g), três antagonistas (IL-1Ra, IL-36Ra e IL-38) e uma citocina anti-inflamatória (IL-37) (GARLANDA *et al.*, 2013). Todos os membros desta família, com exceção da IL-18 e da IL-33, são codificados, em humanos, por genes localizados em uma região de 400kb no cromossomo 2 (NICKLIN *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2002), sendo que alguns deles são produzidos como proteínas precursoras, já biologicamente ativas, ou que, então, precisam ser processadas enzimaticamente para que a forma madura gerada exerça função biológica (NETEA *et al.*, 2015). De acordo com o tamanho do precursor e o comprimento do segmento N-terminal *propiece*, as citocinas da família da IL-1 podem ser divididas em três subfamílias. A primeira delas, subfamília IL-1, na qual estão a IL-1 α , IL-1 β e IL-33, contém *propiece* longos, cujo comprimento é maior do que a segunda subfamília, constituída por IL-18 e IL-37 (GARLANDA *et al.*, 2013). Por fim, os de menores tamanho são encontrados na IL-36 (α , β , γ e IL-36Ra) bem como na IL-38, as quais pertencem a subfamília IL-36 (GARLANDA *et al.*, 2013).

A IL-1, como o próprio nome sugere, foi a primeira interleucina a ser descrita. Antes da sua identificação molecular, em 1980, essa citocina já havia sido estudada durante anos, porém, devido as suas várias funções biológicas, diferentes nomes eram utilizados para referir-se a ela, tais como mediador endógeno de leucócito, hematopoetina 1, pirógeno endógeno, catabolina e fator ativador de osteoclasto (SIMS e SMITH, 2010). Esse espectro

diversificado de atividades da IL-1 é mediado por duas proteínas, codificadas separadamente, a IL-1 α e a IL-1 β , que, surpreendentemente, tem apenas 26% de homologia entre seus aminoácidos (AURON *et al.*, 1984; MARCH *et al.*, 1985).

A IL-1 α e a IL-1 β , transcritas a partir de genes diferentes, são traduzidas, no citoplasma, por ribossomos associados ao citoesqueleto, nas formas precursoras de 31 e 35kDa, respectivamente, porém devido a perda da sequência peptídeo sinal, não são direcionadas para a via clássica de secreção, que envolve o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (RUBARTELLI *et al.*, 1990; STEVENSON *et al.*, 1992). Para explicar o mecanismo de liberação da IL-1 β , modelos distintos da via secretória não clássica foram postulados. Em particular, sugere-se que ela seja exportada, para circular sistemicamente durante processos inflamatórios, através da exocitose de lisossomos secretórios (ANDREI *et al.*, 1999) e de exossomos (QU *et al.*, 2007) ou por meio de microvesículas (MACKENZIE *et al.*, 2001; BIANCO *et al.*, 2005; PIZZIRANI *et al.*, 2007) e transportadores especializados presentes na membrana plasmática (HAMON *et al.*, 1997; ZHOU *et al.*, 2002; MARTY *et al.*, 2005). Em adição, a lise da célula com subsequente liberação passiva dos componentes citoplasmáticos, inclusive da IL-1 β , também pode ser um possível mecanismo (HOGQUIST *et al.*, 1991; LALIBERTE *et al.*, 1999), como acontece para a IL-1 α , que pode ser liberada por células necróticas (DAGVADORJ *et al.*, 2015) ou permanecer associada à membrana da célula produtora, atuando localmente (KURT-JONES, BELLER, *et al.*, 1985; KURT-JONES, VIRGIN, *et al.*, 1985).

A síntese e a liberação de IL-1 β por monócitos, macrófagos e células dendríticas (DINARELLO, 2011), são dependentes, primeiro, da indução transcricional da pró-forma de 35kDa, denominada, pró-IL-1 β , via NF- κ B, e depois da proteólise dessa forma inativa, mediada por caspase-1, para produzir a IL-1 β madura (17kDa) com atividade biológica (THORNBERRY *et al.*, 1992). Em contrapartida, a IL-1 α , cuja proteína precursora, biologicamente ativa, contém uma sequência de localização nuclear (GRENFELL *et al.*, 1989; NICKLIN *et al.*, 2002; WERMAN *et al.*, 2004) e é expressa constitutivamente em queratinócitos, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos (HACHAM *et al.*, 2002; DINARELLO, 2009), ainda que seja encontrada em sua forma clivada, desempenha seus efeitos biológicos mesmo que esse processamento não ocorra. Sua clivagem, quando acontece, é mediada pela calpaínas (proteases ativada por cálcio), e não por caspase-1, no entanto, é dispensável para que aconteça a ligação ao receptor de superfície IL-1R1 (MOSLEY *et al.*, 1987; KOBAYASHI *et al.*, 1990; CARRUTH *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 1994; GROSS *et al.*, 2012).

A IL-1 α e a IL-1 β ligam-se, primeiro, a subunidade responsável pelo reconhecimento do ligante (IL-1R1), composta por três domínios de imunoglobulinas, o que leva a formação de um heterodímero entre a cadeia IL-1R1 e o correceptor IL-1RAcP, denominado proteína acessória. A interação homofílica entre dois domínios TIR habilita o recrutamento da proteína adaptadora MyD88 que, em seguida, desencadeia uma resposta inflamatória típica, envolvendo NF- κ B e MAPK (O'NEILL, 2008; WEBER *et al.*, 2010). Um complexo de sinalização de alta afinidade, semelhante ao do receptor IL-1R1, é, similarmente, formado entre as cadeias α e β do receptor da IL-18 (IL-18R α

e IL-18R β , respectivamente), após a ligação IL-18 / IL-18R α (DINARELLO, 2000; 2011). A expressão da subunidade IL-18R β , essencial para a transdução de sinal, é aumentada por IL-12 e IL-15, as quais, em sinergismo com a IL-18, induzem a produção de IFN- γ e desenvolvimento da resposta Th1 (DINARELLO, 2007).

Diferente da IL-1 β , a IL-18 é constitutivamente expressa pela maioria das células de indivíduos saudáveis. A caspase-1 cliva o precursor intracelular inativo de 24kDa (pró-IL-18), no resíduo de aminoácido Asp36, convertendo-o em uma molécula de 17,2kDa, que é secretada (GHAYUR *et al.*, 1997; GU *et al.*, 1997). A caspase-1, descrita em monócitos e nomeada à princípio como ICE (*IL-1 β -converting enzyme*) (KOSTURA *et al.*, 1989; THORNBERRY *et al.*, 1992), é sintetizada no citoplasma de células fagocíticas como um zimogênio inativo de 45kDa (p45) que possui um pró-domínio CARD (*caspase recruitment domain*) de comprimento variável seguido de duas subunidades catalíticas: uma de 10 e outra de 20 kDa (LAMKANFI *et al.*, 2002).

Depois de incontáveis estímulos, com a proximidade de dois ou mais monômeros de caspase-1 (THORNBERRY *et al.*, 1992; MARTINON *et al.*, 2002), a pró-enzima é, inicialmente, auto-ativada e, por clivagem proteolítica, a p45 é convertida em um fragmento de 35kDa (p35), que contém CARD, e outro de 10kDa (p10). Em sequência, a fração de maior peso molecular (p35) é processada em CARD e na subunidade p20. Duas moléculas de p20, então, se dimerizam com duas moléculas de p10, para formar um heterotetrâmero, enzimaticamente ativo, cuja atividade é regulada por membros da família dos receptores *Nod-like* (INOHARA e NUNEZ, 2003; MARIATHASAN e MONACK, 2007).

1.8. Os receptores do tipo *Nod-like*

Os receptores do tipo *Nod-like* (NLRs), diferente dos TLRs, são proteínas citoplasmáticas solúveis (KUFER *et al.*, 2005; MEYLAN *et al.*, 2006), expressas em linfócitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e mesoteliais (CHEN *et al.*, 2009), que reconhecem, intracelularmente, moléculas microbianas (MARTINON e TSCHOPP, 2005; FRANCHI, WARNER, *et al.*, 2009) e sinais endógenos liberados por tecidos submetidos à destruição (MARTINON *et al.*, 2006; PEDRA *et al.*, 2009; MARTINON, 2010). Com 23 membros em humanos, 34 em camundongos (HARTON *et al.*, 2002; RATHINAM, VANAJA e FITZGERALD, 2012) e homólogos presentes em plantas (genes R – R para resistência) e organismos filogeneticamente primitivos, tais como o *Zebrafish* e ouriço do mar, mas ausentes em insetos e vermes (INOHARA e NUNEZ, 2003; HIBINO *et al.*, 2006), esses receptores apresentam uma estrutura característica, composta por três domínios distintos. Uma região carboxiterminal rica em leucina, denominada LRR, que assim como nos TLRs, são responsáveis pelo reconhecimento antigênico; um domínio NBD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), responsável pela oligomerização do receptor após ligação ao ATP e um amino-terminal, o qual desencadeia a função efetora do receptor e que pode conter domínios como CARD (*caspase recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) ou BIR (*baculoviral inhibitory repeat-like domain*) (ATHMAN e PHILPOTT, 2004; MEYLAN *et al.*, 2006; WILMANSKI *et al.*, 2008).

As diferenças nas porções N-terminais dividem os NLRs em 2 grandes subgrupos: o primeiro e maior deles, no qual estão inseridos 14 membros com

domínio rico em pirina (PYD), denomina-se NLRP; o segundo, formado por aqueles que compartilham o domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD), categoriza-se como NLRC, tais como NLRC1 (também conhecido como NOD1 ou CARD4), NLRC2 (também conhecido com NOD2 ou CARD15) e NLRC4 (também conhecido como CARD12, CLAN e IPAF) (TING *et al.*, 2008). Uma característica importante desses receptores é a capacidade de regular a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, através da montagem de uma plataforma macromolecular de 700kDa designada inflamassoma (MARTINON *et al.*, 2002).

Em analogia com o apoptossoma, que ativa caspases indutoras de apoptose (ZOU *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2005; BAO e SHI, 2007), o inflamassoma controla caspases inflamatórias (MARTINON *et al.*, 2002; MARTINON *et al.*, 2009). A palavra caspase, introduzida em 1996, foi criada para referir-se aos dois papéis funcionais desta classe de enzimas: o "c" indica que são cisteínas proteases e o "aspase" remete a sua habilidade de clivar um limitado número de substratos após resíduos de ácido aspártico (ALNEMRI *et al.*, 1996).

A função das caspases tem sido extensivamente estudada na apoptose, na qual elas são essenciais na ativação e implementação da morte celular (NICHOLSON, 1999). Contudo, com base na especificidade ao substrato, várias caspases, incluindo as humanas caspase-1, caspase-4 e caspase-5, e as murinas caspase-1, caspase-11 e caspase-12, estão envolvidas no processamento e secreção de moléculas pró-inflamatórias e, por isso, são, frequentemente chamadas e classificadas como caspases inflamatórias (MARTINON e TSCHOPP, 2004; 2007). Com exceção da caspase-12, todas as

outras caspases inflamatórias participam da ativação do inflamassoma (LATZ *et al.*, 2013; LAMKANFI e DIXIT, 2014; MAN e KANNEGANTI, 2015), complexo de alto peso molecular que ativa caspases inflamatórias induzindo a secreção de IL-1 β (MARTINON *et al.*, 2002).

1.9. Os inflamassomas e suas vias

O termo inflamassoma originou-se da junção entre inflamação, que reflete a função desse complexo, e o sufixo “soma”, que, em grego, significa corpo e é frequentemente utilizado em biologia celular e molecular para definir entidades ou complexos moleculares, tais como proteassoma, lipossomas e ribossomas (ZOU *et al.*, 1999). Os inflamassomas foram inicialmente descritos como um complexo multiprotéico formado pela proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*), também conhecida como TMS1, e por um receptor NLR que induz a ativação de caspase-1 (MARTINON *et al.*, 2002).

Na literatura são descritos e caracterizados tipos distintos de inflamassomas, dentre eles: o inflamassoma de NLRP1, que medeia a secreção de IL-1 β em resposta a toxina Anthrax (CHAVARRIA-SMITH e VANCE, 2013; LEVINSOHN *et al.*, 2012; AVERETTE *et al.*, 2009); o inflamassoma de AIM2 (BURCKSTUMMER *et al.*, 2009; HORNUNG *et al.*, 2009; ROBERTS *et al.*, 2009), que ativa caspase-1 frente a infecção por vírus de DNA; o inflamassoma de RIG-I, o qual responde a RNA viral (Poeck *et al.*, 2010); o inflamassoma de NLRC4/IPAF, que regula a resposta imune contra bactérias intracelulares como *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*

e *Pseudomonas aeruginosa* (MARIATHASAN *et al.*, 2004; AMER *et al.*, 2006; FRANCHI *et al.*, 2006; MIAO *et al.*, 2006; SUTTERWALA *et al.*, 2007) e o inflamassoma NLRP3 que é ativado por estímulos endógenos e exógenos, incluindo cristais de ácido úrico e de sílica (MARTINON *et al.*, 2006; DOSTERT *et al.*, 2008; HORNUNG *et al.*, 2008), bactérias (KANNEGANTI *et al.*, 2006), toxinas bacterianas formadoras de poro (MARIATHASAN *et al.*, 2006), DNA e RNA viral (MURUVE *et al.*, 2008; ALLEN *et al.*, 2009; ICHINOHE *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2009), adjuvantes de alumínio (EISENBARTH *et al.*, 2008) e β -amilóide fibrilar (HALLE *et al.*, 2008).

Na ausência de infecção, o NLR encontra-se em uma forma inativa, em que as regiões efetoras permanecem protegidas pela região LRR, a qual bloqueia sua atividade. O reconhecimento antigênico permite que o ATP se ligue ao domínio NOD e cause sua oligomerização. Essa mudança na conformação do receptor expõe o domínio efetor, que então interage com a proteína adaptadora ASC, levando a ativação de caspases inflamatórias, como a caspase-1, e a formação do inflamassoma ativo (INOHARA *et al.*, 2005).

Acredita-se que ASC atue tanto como uma plataforma molecular que suporta as interações proteína-proteína durante a montagem do inflamassoma (CAI *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2014) como uma ponte direta entre o sensor NLR e a molécula efetora da via, caspase-1 (MARTINON e TSCHOPP, 2004). A razão para isso é que a proteína adaptadora de 22kDa, ASC, contém uma região N-terminal PYD e uma C-terminal CARD, que funcionam como domínios de recrutamento de outras moléculas que também os tenham em sua estrutura (MASUMOTO *et al.*, 1999). Portanto, os receptores NLRs recrutam a proteína adaptadora ASC através de interações homofílicas PYD-PYD, a qual, por sua

vez atrai caspase-1 para a plataforma de sinalização por meio de interações CARD-CARD (OGURA *et al.*, 2006; MARIATHASAN e MONACK, 2007).

Uma etapa crítica, que precede a ativação de caspase-1, é a nucleação de ASC desencadeada pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os domínios PYD (MORIYA *et al.*, 2005; SBORGI *et al.*, 2015). As moléculas dispersas no citoplasma se redistribuem para formar, dentro da célula, agregados perinucleares de 0,8 a 1 μ M, denominados *specks* (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007; BRYAN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009), que, então, se polimerizam, gerando filamentos necessários para que a liberação das subunidades p10 e p20 da caspase-1 e o subsequente processamento da IL-1 β e da IL-18 aconteça (LIEPINSH *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2014). Dada a capacidade dos domínios PYD e CARD de se reunirem em estruturas filamentosas, mesmo com a ativação de poucos NLRs, o evento de nucleação de ASC permite que o *speck* sirva como ancoradouro de mais monômeros solúveis de ASC. Esse mecanismo priônico auto-propagante potencializa a inflamação, de forma a amplificar e perpetuar a magnitude da resposta do inflamassoma (CHENG *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2014; FRANKLIN *et al.*, 2014).

Estudos recentes revelaram, ainda, que sob condições de repouso, ASC além de ser encontrada no citoplasma (PARK *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013), também está no núcleo (BRYAN *et al.*, 2009) e na mitocôndria (SUBRAMANIAN *et al.*, 2013). Para associar-se com NLRP3, no retículo endoplasmático (ER) (ZHOU *et al.*, 2011), e formar o inflamassoma de NLRP3 o transporte mediado por dineína altera a localização subcelular desses componentes, rearranjando-os espacialmente de forma a aproximar a

mitocôndria do ER, para permitir a justaposição de ASC e NLRP3 (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007; MISAWA *et al.*, 2013).

1.9.1. Via canônica do inflamassoma de NLRP3

O NLRP3, também conhecido como CIAS1, Cryopyrin, NALP3 ou Pypaf1, foi identificado, pela primeira vez, como um gene cuja mutação de ganho de função, em humanos, estava associada com o desenvolvimento de um grupo de síndromes hereditárias autoinflamatórias, designadas como CAPS (*cryopyrin-associated periodic syndromes*), as quais eram caracterizadas por erupções cutâneas e episódios recorrentes de febre (HOFFMAN *et al.*, 2001; FELDMANN *et al.*, 2002; NEVEN *et al.*, 2004). As mutações dentro ou ao redor da região NBD (MASTERS *et al.*, 2009) resultavam na ativação constitutiva de NLRP3 e, devido a isso, pacientes acometidos pela doença produziam quantidades exacerbadas de IL-1 β (AKSENTIJEVICH *et al.*, 2002; AGOSTINI *et al.*, 2004). No entanto, a ativação desregulada de NLRP3 também demonstrou desempenhar um papel central em doenças multifatoriais como diabetes tipo 2, doença de Alzheimer, gota e aterosclerose.

Um limitante para a ativação desse inflamassoma é a baixa expressão de NLRP3, que embora seja constitutiva em macrófagos e células dendríticas, assim como ASC e caspase-1 (BAUERNFEIND *et al.*, 2009; GUARDA *et al.*, 2011), pode ser significativamente aumentada pelo sinal via NF- κ B, chamado de *priming* (O'CONNOR *et al.*, 2003). A etapa de *priming* além de induzir pró-IL-1 β e aumentar os níveis de transcritos de NLRP3, reduzindo consequentemente o limiar de ativação do inflamassoma, licencia a ativação do NLRP3 desubiquitinando-o (JULIANA *et al.*, 2012; LOPEZ-CASTEJON *et al.*,

2013; PY *et al.*, 2013). Contudo, para que ocorra a ativação do inflamassoma de NLRP3 o sinal 1 de *priming* não é suficiente. É necessário que células sejam expostas subsequentemente à ativadores do inflamassoma (LAMKANFI e DIXIT, 2009; TSCHOPP e SCHRODER, 2010).

Embora o gatilho preciso para sua ativação seja desconhecido, o inflamassoma canônico de NLRP3, constituído por NLRP3, ASC e caspase-1, responde a um amplo repertório de agonistas, no qual estão inseridos bactérias (DUNCAN *et al.*, 2009; HARDER *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010; MEIXENBERGER *et al.*, 2010; TOMA *et al.*, 2010; SHIMADA *et al.*, 2011), fungos (GROSS *et al.*, 2009; HISE *et al.*, 2009), vírus (ALLEN *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2009; ICHINOHE *et al.*, 2010; RAJAN *et al.*, 2011) e protozoários (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013). A diversidade de ligantes e a divergência estrutural e molecular dos ativadores do inflamassoma de NLRP3 torna improvável a possibilidade de um reconhecimento direto de cada um deles. Em vez disso, pressupõem-se que este NLR monitore sinais endógenos liberados e/ou produzidos pelo hospedeiro como consequência da injúria tecidual ou celular gerada pela infecção (LAMKANFI e DIXIT, 2009). Por conseguinte, ocorreria a detecção de um produto citosólico comum, exposto, modificado ou gerado pela ação dos diferentes estímulos (SHARMA e KANNEGANTI, 2016).

Apesar de um número considerável de esforços, ainda não há, todavia, um consenso na literatura a respeito do mecanismo unificado que levaria a ativação do inflamassoma de NLRP3. Alguns eventos celulares tem sido propostos, como por exemplo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CRUZ *et al.*, 2007), o efluxo de potássio (PERREGAUX e GABEL,

1994; PETRILLI *et al.*, 2007; MUNOZ-PLANILLO *et al.*, 2013), as mudanças no volume celular (COMPAN *et al.*, 2012), o DNA mitocondrial oxidado (SHIMADA *et al.*, 2012), o aumento na concentração intracelular de cálcio e a diminuição de AMP cíclico (LEE *et al.*, 2012; MURAKAMI *et al.*, 2012), a desestabilização lisossomal (HORNUNG *et al.*, 2008) e a translocação de cardiolipina da membrana mitocondrial interna para a externa (IYER *et al.*, 2013). A identidade desse sinal até o momento está sob intenso debate e permanece enigmática.

1.9.2. Vias não canônicas do inflamassoma de NLRP3

1.9.2.1. Caspase-11

Embora possa interagir com a caspase-1 (WANG *et al.*, 1998) e colaborar com a produção de IL-1 β , a ativação de caspase-11 culmina, majoritariamente, na liberação de IL-1 α (KAYAGAKI *et al.*, 2011; CASE *et al.*, 2013; CASSON *et al.*, 2013). A existência de uma rota alternativa, distinta daquela clássica, previamente descoberta, em que uma caspase inflamatória, que não a caspase-1, está envolvida, foi definida como via não canônica de caspase-11. A ativação dessa via não canônica de caspase-11 em resposta à bactérias gram-negativas, mas não gram-positivas (KAYAGAKI *et al.*, 2011; BROZ, RUBY, *et al.*, 2012; RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, *et al.*, 2012), foi explicada quando descobriu-se, nos últimos anos, que o LPS, componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, entregue intracelularmente por transfecção, eletroporação ou por bactérias que atingem o citoplasma (CASE *et al.*, 2013; CASSON *et al.*, 2013) sinaliza, independente de TLR4, ligando-se diretamente à caspase-11 (HAGAR *et al.*, 2013; KAYAGAKI *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2014). O reconhecimento extracelular de LPS por TLR4-TRIF,

através de STAT1 e IRF9, controlaria, em contrapartida, a expressão de caspase-11 induzindo a produção de IFN do tipo 1 (BROZ, OHLSON, *et al.*, 2012; GURUNG *et al.*, 2012; RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, *et al.*, 2012).

Desde a sua descoberta, a via não convencional de ativação do inflamassoma tem sido objeto de intensa investigação. Além do modo não canônico de ativação do inflamassoma, que envolve caspase-11, caspase-8 também funciona como uma plataforma para a síntese e processamento da pró-IL-1 β (VINCE *et al.*, 2012; ALLAM *et al.*, 2014; GURUNG *et al.*, 2014).

1.9.2.2. Caspase-8

A caspase-8, sintetizada como um zimogênio formado por dois domínios efetores de morte (DED) e dois domínios ativos (p18 e p10) (ZHAO *et al.*, 2010), é conhecida, principalmente, como iniciadora da via extrínseca da apoptose, acionada pelos receptores TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) e CD95/Fas (ASHKENAZI e DIXIT, 1998). Contudo, surpreendentemente, nem sempre a caspase-8 está envolvida na sinalização apoptótica. Trabalhos recentes destacam sua participação inesperada na supressão da forma programada de necrose, chamada de necroptose, no desenvolvimento embrionário, na diferenciação de monócitos, na proliferação de células T e células B e na produção de IL-1 β em condições nas quais a sinalização do inflamassoma canônico é evitada ou em resposta à agentes infecciosos que não estimulam essa via (MAELFAIT *et al.*, 2008; OBERST e GREEN, 2011; BOSSALLER *et al.*, 2012; GRINGHUIS *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2013).

A ativação de caspase-8 contribui para a produção de IL-1 β após o reconhecimento de β -glucanas (GRINGHUIS *et al.*, 2012; GANESAN *et al.*,

2014) por dectina-1. A ligação à dectina-1 induz a fosforilação dos resíduos de tirosina, contidos na cauda citoplasmática do receptor (GEIJTENBEEK e GRINGHUIS, 2009), o que acarreta na associação da tirosina quinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) como pré-requisito importante para a montagem do complexo CARD9-Bcl10-MALT1 (ROGERS *et al.*, 2005; GROSS *et al.*, 2006). CARD9-Bcl10-MALT1, por fim, recrutam ASC para formar a via não canônica de caspase-8, através da qual o processamento da pró-IL-1 β é mediado diretamente por essa protease (GRINGHUIS *et al.*, 2012). De forma interessante, caspase-8 cliva a forma inativa da IL-1 β exatamente no mesmo local que a caspase-1 (MAELFAIT *et al.*, 2008; VINCE *et al.*, 2012) e também co-localiza com os *specks* de ASC nas infecções por *S. typhimurium* (MAN *et al.*, 2013; MAN *et al.*, 2014), *Francisella novicida* (PIERINI *et al.*, 2012) e *A. fumigatus* (KARKI *et al.*, 2015).

A retenção de caspase-8 junto ao complexo CARD9-Bcl10-MALT1, estabiliza-o e, ao mesmo tempo, restringe o acesso da caspase-8 aos substratos pró-apoptóticos (THOME, 2004). No entanto, o complexo CARD9-Bcl10-MALT1 acopla também a sinalização de dectina-1 à via canônica do NF- κ B através da ativação de IKK (*I κ B kinase*), que ao adicionar um fosfato à molécula inibidora de NF- κ B, I κ B, permite a translocação do NF- κ B para o núcleo (GRINGHUIS *et al.*, 2009). Todavia, até o momento não existe na literatura um consenso a respeito do mecanismo pelo qual caspase-8 influenciaria na sinalização do NF- κ B.

Ao passo que alguns trabalhos sugerem que os domínios ativos, importantes para a atividade catalítica da caspase-8, são cruciais para a ativação de NF- κ B (SU *et al.*, 2005), outros indicam que somente os domínios

DEDs já são suficientes (ANDO *et al.*, 2013). Independente de como acontece a ativação de NF- κ B, caspase-8 regula a síntese de pró-IL-1 β (GURUNG *et al.*, 2014) e cliva caspase-1 *in vitro* (PHILIP *et al.*, 2014), para permitir, deste modo, a liberação de IL-1 β ativa em resposta ao ATP, *C. rodentium*, *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *A. fumigatus* (GURUNG *et al.*, 2014; PHILIP *et al.*, 2014; WENG *et al.*, 2014; KARKI *et al.*, 2015). Como as caspases -1 e -8 operam tanto de forma sinérgica como independentemente uma da outra, a natureza dos ativadores que determinam essa relação é uma questão que ainda precisa ser elucidada.

Não restam dúvidas de que os diversos inflamassomas, agindo isoladamente ou em conjunto, estão envolvidos na indução de resistência ou suscetibilidade à infecções. O surgimento de inflammasomas não canônicos e não redundantes para o processamento da pró-IL-1 β enfatiza a diversidade e versatilidade da resposta imune contra patógenos e indica que vários inflammasomas podem se formar durante uma infecção *in vivo*.

A investigação dos mecanismos e das dinâmicas de montagem de cada um destes inflammasomas, das suas redundâncias e sinergismos, de seus agonistas e de suas especificidades faz-se necessária para uma compreensão mais profunda da complexa interação hospedeiro-patógeno. Adicionalmente, a avaliação da importância funcional das vias canônica e não canônica do inflamassoma na modulação da resposta imune durante a infecção por *P. brasiliensis* torna-se relevante para que no futuro esse conhecimento possa auxiliar na elaboração de estratégias clínicas que reduzam a severidade da inflamação granulomatosa e que melhorem a qualidade de vida do paciente. Uma melhor compreensão destes processos e uma caracterização destas

redes reguladoras poderia revelar novos alvos, abrindo perspectiva para o desenvolvimento de tratamentos seletivos que prevenissem a inflamação prejudicial.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel das vias canônica e não canônica do inflamassoma na geração e/ou modulação de uma resposta imune protetora durante a infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Analisar qual a via de sinalização celular *upstream* que culmina na produção de IL-1 β , evidenciando o envolvimento de NLRP3, ASC e caspase-1 durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*;

2.2.2. Investigar os mecanismos responsáveis pela ativação do inflamassoma canônico de NLRP3 em macrófagos cultivados com *P. brasiliensis*;

2.2.3. Verificar a participação da via não canônica de caspase-11 na indução de piroptose e na liberação de IL-1 β e IL-1 α após a infecção por *P. brasiliensis*;

2.2.4. Determinar a relação entre caspase-8 e a via canônica do inflamassoma durante a infecção *in vitro* por *P. brasiliensis* focando no efeito regulador que uma exerce sobre a outra;

2.2.5. Identificar a relevância biológica das vias canônica de caspase-1 e não canônica de caspase-11 na resistência ou suscetibilidade do hospedeiro frente a infecção por *P. brasiliensis*;

2.2.6. Caracterizar *in vivo* a influência das vias do inflamassoma na modulação das resposta Th1 e Th17 em modelo de paracoccidioidomicose experimental.

—— *Material e Métodos*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Cultura de leveduras de P. brasiliensis.* As amostras dos isolados 18 (Pb18) e 60855 (Pb60855) foram cultivadas por 7 dias à temperatura média de 37°C em meio BHI (Brain Heart Infusion)-ágar suplementado com 96 µg/mL de gentamicina e 5% de soro bovino fetal (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). As leveduras da cepa 60855 (ATCC 60855) foram gentilmente doadas pelo Dr. B. S. Klein (*University of Wisconsin, Madison, WI*).

3.2. *Preparo das leveduras para inóculo.* Após 7 dias de cultivo, as colônias de fungo foram coletadas das placas de BHI-ágar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de meio líquido F12 Coon's Modification (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) onde os grumos foram separados pelo processo de sucção por pressão negativa usando pipeta graduada de 100 µL. Em seguida, o extrato aquoso fúngico foi mantido *overnight* em 50 mL de meio líquido F12 à 37°C, sob agitação constante de 150 rpm em *Thermo Forma Orbital Shaker* modelo 420. Após repouso à temperatura ambiente por 3 minutos, 30mL da suspensão de leveduras foram transferidos para tubos cônicos e centrifugados por 10 minutos à 1300 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado fúngico ressuspensionado em tampão fosfato estéril (PBS, pH 7,2) e as leveduras contadas em câmara de Neubauer. A concentração de células fúngicas foi ajustada para 1×10^7 leveduras/mL em PBS estéril, sendo que 100 µL dessa solução foram inoculados em cada animal.

3.3. *Viabilidade das leveduras.* Para determinar a viabilidade das células leveduriformes antes do uso, 100 µL da suspensão fúngica a 1×10^7

leveduras/mL foram incubados por 10 minutos com 100 µL de diacetato de fluoresceína (DAF, 2 µg/mL) e 100 µL de brometo de etídio (50 mg/mL). A contagem de leveduras viáveis foi realizada através da análise de fluorescência das células marcadas em verde (CALICH et al., 1979). As células fúngicas tem a propriedade de acumular fluoresceína (fluocromasia) enquanto o brometo de etídio penetra rapidamente em células danificadas, formando um complexo vermelho fluorescente ao se ligar ao DNA por intercalação. Desse modo, boa viabilidade foi considerada quando aproximadamente 80% das leveduras eram DAF positivas.

3.4. Animais experimentais e infecção por *Pb18*. Nos experimentos realizados *in vivo* e/ou *in vitro* foram utilizados camundongos machos, com 6 a 7 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 (WT), assim como camundongos desse mesmo background genético *Casp1¹¹^{-/-}*, *Casp1¹¹^{-/-}*, *Casp1¹¹^{-/-}Casp11^{Tg}* e *Il1α^{-/-}*, obtidos junto ao biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/ USP. Todos os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos e criados com água e ração *ad libitum* no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (protocolo 001/2014 disponível no **Anexo 2**). Algumas linhagens de camundongos transgênicos (*Rip3¹¹^{-/-}*, *Rip3¹¹^{-/-}*, *Casp8¹¹^{-/-}* e *Clec7a¹¹^{-/-}*), cujas colônias ainda não estão disponíveis no Brasil, foram utilizadas durante o estágio de pesquisa na *University of Massachusetts*

Medical School sob supervisão da Dra. Katherine Fitzgerald. Exceto quando indicado, a infecção dos animais foi feita pela via intravenosa com 1×10^6 ou leveduras viáveis de Pb18, e os experimentos foram realizados utilizando 5 camundongos por grupo.

3.5. Recuperação de fungos e contagem de unidade formadoras de colônia (CFU). Fragmentos de pulmão e fígado foram retirados de camundongos infectados por *P. brasiliensis* aos 15 e 30 dias após a infecção (dpi). Após pesagem, estes órgãos foram triturados em 1mL de solução inibidora de proteases (Complete®, Roche, Mannheim, Alemanha) e 50 µL do macerado foram diluídos em 450 µL de PBS 1x estéril. Em seguida, 100 µL da amostra diluída foram semeados em placas de Petri estéreis descartáveis (90 x 15 mm, Corning, NY, EUA) contendo meio BHI-ágar enriquecido com 96 µg/mL de gentamicina e 5% de soro bovino fetal. As placas foram mantidas por um período de 7 dias a uma temperatura média de 37°C, e então a avaliação da recuperação de fungos viáveis foi determinada através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Os valores foram expressos por grama de tecido.

3.6. Obtenção do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Lóbulos de pulmão foram coletados em tubos criogênicos contendo 1 mL de PBS estéril e 1,6 mM de inibidor de proteases Complete (Roche, Mannheim, Alemanha). Em seguida, os órgãos foram lisados por homogeneização com triturador mecânico (IKA®-Werke). Após centrifugação a 1600 g a 4°C por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C, até o momento, da dosagem de citocinas por ELISA.

3.7. Dosagem de citocinas por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com tampão de ligação contendo anticorpo de captura (diluído conforme recomendações do fabricante) e incubadas *overnight* a 4°C. Após quatro lavagens com PBS 0,05% de Tween 20® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio, por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas, como descrito acima, e as amostras e os padrões com concentrações conhecidas foram adicionados aos poços. Depois de 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a etapa de lavagem da placa se repetiu e 100 µL de uma solução contendo anticorpo de detecção biotinilado foi acrescentada a cada well. Uma vez retirado o excesso de anticorpo de detecção com sucessivas lavagens, o próximo passo foi adicionar solução contendo substrato e cromógeno da peroxidase, *tetra-methyl-benzidine* (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, EUA). Passados 15 minutos, a reação foi finalizada pela adição de H₂SO₄ 1N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA eMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), medindo-se a densidade óptica por poço, em 450 nm. A detecção e quantificação foram avaliadas segundo a curva padrão obtida. Os resultados foram representados na concentração de picogramas por mililitro (pg/mL).

3.8. Análise histopatológica das lesões.

Lóbulos pulmonares foram coletados no dia 15 e 30 após a infecção, fixados em formol tamponado e, após 48 horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol e clarificados em xilol. Os órgãos foram inclusos em blocos de parafina e cortes de 5 µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 60°C para fixação. Em seguida, o material foi lavado em

xilol para retirar o excesso de parafina e reidratado com concentrações decrescentes de etanol (do absoluto ao 80%). Os cortes foram então corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise do processo inflamatório e da evolução da resposta granulomatosa, ou pelo método de Gomori para confirmação da carga fúngica e para a marcação de fibras de reticulina. Desidratadas com concentrações crescentes de álcool (de 80% ao absoluto) e lavadas com xilol, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil), cobertas com lamínula e analisadas em microscópio óptico comum acoplado à uma câmera digital (Olympus).

3.9. Isolamento de leucócitos pulmonares. Lóbulos pulmonares de camundongos selvagens ou geneticamente modificados foram coletados aos 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Posteriormente, o tecido foi fragmentado e incubado por 1 hora à 37°C em meio RPMI-1640 incompleto contendo 2 mg/mL de colagenase I (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 1 mg/mL de DNase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a digestão enzimática, para obtenção das células, o macerado, proveniente dos fragmentos digeridos, foi filtrado sobre filtros de 50 µm (Filcon, Falcon products). A suspensão celular foi centrifugada à 250 g por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante descartado e, ao homogenato celular foi adicionado 1 mL de tampão de lise para eliminação de hemáceas. Após 1 minuto, as células foram lavadas com 10 mL de PBS, centrifugadas e ressuspensas em RPMI-1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal. Alíquotas celulares foram diluídas 100 vezes em azul de Tripán e a contagem de leucócitos efetuada em câmara de Neubauer. Em seguida, para marcação intracelular de citometria de fluxo, 2×10^6 células foram cultivadas por 4 horas a 37°C em placas de 48 poços sob estímulo de 50 ng/mL de PMA

(Abcam, Cambridge, MI, UK), 500 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e brefeldina A (BioLegend, San Diego, CA, EUA).

3.10. Citometria de fluxo. A análise da expressão de marcadores intracelulares e de superfície, no intuito de caracterizar a população de linfócitos T, macrófagos e neutrófilos foi realizada em leucócitos recuperados do pulmão (30º dia de infecção) de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Para tal fenotipagem, avaliamos os subtipos celulares de acordo com a expressão das moléculas: CD3, CD4, CD11b, CD11c, F4/80, MHC II, Ly6G e IL-17. Em geral, as células foram incubadas com soro de coelho 10% por 30 minutos à 4°C. Em seguida, 10⁶ células foram permeabilizadas e a elas foram adicionados por 30 minutos à 4°C anticorpos monoclonais conjugados com os fluorocromos FITC, PE, PerCP, APC, APC-Cy7 e PE-Cy7 (todos obtidos da BD Pharmingen, San Jose, EUA). Após a incubação, as amostras foram lavadas com PBS, sendo centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACSCantoll (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para moléculas conjugadas a FITC; 2 (FL2) para àquelas conjugadas a PE; e 3 (FL3) para moléculas conjugadas a PerCP. As análises foram feitas usando o programa FlowJo (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100000 por amostra de lóbulo pulmonar) baseado em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.11. Reação de Imunohistoquímica (IHQ). A técnica de IHQ foi realizada para avaliar a expressão de Ly6G (BioLegend, San Diego, CA, EUA) no pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Cortes de 5 µm de tecido

pulmonar, congelados em meio OCT (Sakura Finetek Inc., Torance, CA, EUA), foram fixados em acetona 100% por 10 minutos à -20°C. Em seguida, a peroxidase endógena do tecido foi bloqueada através da incubação dos cortes com PBS-H₂O₂ 3% por 30 minutos. Após a lavagem com PBS, os cortes foram incubados por 30 minutos com leite desnatado 3% (Molico, Nestle, SP, Brasil), a fim de bloquear as ligações protéicas inespecíficas. O anticorpo primário utilizado para marcação da molécula de superfície foi diluído 500 vezes em PBS contendo 1% de BSA. Após adição do anticorpo, os cortes permaneceram por 90 minutos em câmara úmida à temperatura de 37°C e, subsequentemente, as lâminas foram lavadas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com anticorpos secundários biotinilados (Vector Laboratories). Após repetidas lavagens, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos à temperatura ambiente e a reação foi revelada através da utilização do substrato diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 1 minuto, desidratadas com concentrações crescentes de etanol (do 80% ao absoluto), lavadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). A análise foi realizada em microscópio óptico comum acoplado a uma câmara digital (Olympus).

3.12. Extração de RNA total de tecido pulmonar. Lóbulos pulmonares de camundongos, infectados ou não por *P. brasiliensis*, foram obtidos e armazenados à -70°C em Trizol[®] (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) até o momento da extração do RNA total. O tecido foi homogeneizado com o auxílio de uma haste de trituração autoclavada e tratada com

dimetilpirocarbonato (DEPC), para eliminação de RNase. À mistura foram adicionados 1 mL de Trizol e 200 µL de clorofórmio. Após centrifugação (12000 g, 15 minutos, 4°C), a fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente coletada, transferida para outro tubo com 350 µL de etanol 70%, e purificada através do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA), conforme instruções do fabricante. O RNA das amostras foi quantificado por leitura em NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific) à 260 nm de absorbância (A_{260}) e armazenado à -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.13. Síntese de cDNA. O cDNA foi sintetizado a partir de amostras de RNA total, utilizando *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme as instruções do fabricante. Em resumo, 500 ng de RNA foram diluídos para um volume final de 15 µL e à essa quantia foram adicionados 5 µL de um mix preparado a partir da homogeneização de: 2 µL de RT Buffer (10x), 0,8 µL de dNTP à 100 mM, 1 µL de oligo (dT) à 50 µM, 1 µL da enzima transcriptase reversa e 0,2 µL de água livre de endonucleases. Em seguida, essa mistura foi submetida à ciclagem de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos em termociclador *Mastercycler®nexus Cyclers Eppendorf*. À essa solução foi acrescentado, posteriormente, 180 µL de água livre de endonucleases (diluição de 10 vezes) e o produto foi quantificado por leitura em NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V 3.7.1 (Thermo Fischer Scientific) antes de ser armazenado à -20°C até o momento do uso.

3.14. Reação de PCR em Tempo Real (qPCR). A avaliação do nível de transcritos foi realizada no pulmão de camundongos selvagens e

geneticamente modificados aos 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*, utilizando-se o sistema SYBR Green e o aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Esse sistema (ABI Prism Software) realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras através da utilização de nucleases fluorogênicas, sendo a expressão normalizada com base em controle endógeno (gene $\beta 2$ -microglobulina, constitutivo). Iniciadores adequados para tais reações, também conhecidos por primers, foram criados a partir do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), e suas sequências dispostas no **Anexo 1**. O cDNA de cada amostra (5 μ l) foi adicionado à 7,65 μ L de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 0,5 μ L do iniciador sense (1-2 μ g/reação), 0,5 μ L do iniciador anti-sense (1-2 μ g/reação) e 1,35 μ L de água livre de endonucleases. A amplificação das sequências dos genes alvo e controle interno ($\beta 2$ -microglobulina) foi avaliada através da curva exponencial de amplificação após incubação do material à 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos para desnaturação, 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento e, finalmente, 72°C por 30 segundos. A positividade das reações foi determinada baseando-se em controles negativos, não infectados. Os resultados foram analisados com base no valor da linha de corte Ct (quantification Cycle), definido após o término da reação como o ponto correspondente ao número de ciclos necessários para a detecção da expressão do fator avaliado. Os cálculos para determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados de acordo com instruções contidas no folheto *User's Bulletin* (P/N 4303859, Applied Biosystems), normalizando os dados em relação à expressão constitutiva de $\beta 2$

microglobulina em cada amostra. Brevemente, foram obtidos os valores de ΔCt para cada uma das amostras avaliadas, sendo que $\Delta Ct = Ct \text{ gene interesse} - Ct \text{ gene controle}$ ($\beta 2$ -microglobulina). Assim, quanto menor o valor de ΔCt , maior a expressão do gene de interesse em relação ao gene controle. A expressão relativa do mRNA amostral em relação ao grupo controle de animais não infectados foi calculada através da fórmula: $\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ animal infectado} - \Delta Ct \text{ grupo controle}$.

3.15. Diferenciação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea.

Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea (BMDMs) foram utilizados como modelo para experimentos *in vitro*. As células precursoras de macrófagos, obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos, foram cultivadas em meio RPMI condicionado (meio R10/30), sendo esse suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 30% de sobrenadante de cultura de células L929 (rico em GM-CSF), conforme descrito previamente (WARREN e VOGEL, 1985), com algumas modificações. Resumidamente, camundongos foram eutanasiados, seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos, e, em ambiente estéril, a medula foi lavada com RPMI incompleto utilizando seringa de 5 mL e agulha de 13 x 4,5 mm. As células recém colhidas foram, então, diluídas em meio R10/30 e distribuídas em placas de cultura do tipo Optilux (BD Biosciences), de modo que o volume final por placa utilizada foi de 10 mL (1 fêmur=2placas). Após 4 dias de cultura, um total de 10 mL de meio R10/30 foi adicionado a cada placa e no sétimo dia, as células foram removidas pela

lavagem das monocamadas de macrófagos com PBS gelado contendo 0,02% de EDTA. As células foram fenotipadas por citometria de fluxo - FACSCantoll (BD Bioscience). Os experimentos foram conduzidos com culturas de células possuindo no mínimo 80% depositividade para CD11b e F4/80.

3.16. Diferenciação de células dendríticas a partir de precursores da medula óssea. Para diferenciação de células dendríticas (RATHINAM et al., 2008), progenitores da medula óssea de fêmures de camundongos foram isolados e cultivados, por um período de 7 a 10 dias, em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino inativado, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 50mM de β -mercaptoetanol e 20ng/mL do recombinante de GM-CSF. No dia 7, as células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea (BMDCs), expandidas no dia 4, foram semeadas em placas de cultura e, no dia seguinte, primadas, por 3 horas, com LPS ou Pam3CSK4 (InvivoGen, San Diego, CA, EUA), ambos na concentração de 200ng/mL, antes da infecção de 24 horas por *P. brasiliensis* 60855 a um MOI (*multiplicity of infection*) de 1 ou 5. Quando indicado, antes da adição das leveduras de *P. brasiliensis* à cultura, BMDCs estimuladas com Pam3CSK4 foram tratadas com 50uM dos inibidores de caspase-1 (z-YVAD-fmk) ou caspase-8 (z-IETD-fmk) (ambos Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) por 2 horas ou com 40uM do inibidor de Syk (piceatanol, InvivoGen, San Diego, CA, EUA) por 1 hora. Como controle, as células foram incubadas *overnight* com pdAdT, ativador da via canônica do inflamassoma. Para transfecção do pdAdT, 1ug de poly(dA:dT) para cada um milhão de células foram misturados com 1:2 (v/v) de *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Depois de 15 minutos, os complexos de DNA

em meio Opti-MEM (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) foram adicionados às células dendríticas e incubados por 16 horas.

3.17. Marcação da caspase-1 ativa. Para avaliar a indução de piroptose, 1×10^6 macrófagos foram infectados por 24 horas com *P. brasiliensis* (1 fungo para cada célula). Os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado e transferidos para um tubo de polipropileno. A marcação da caspase-1 ativa foi feita por 1 hora com o reagente carboxyfluorescein FLICA (FAM–YVAD–FMK, Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, EUA), como recomendado pelo fabricante. Após esse período, as células foram lavadas por cinco vezes com PBS/Soro fetal bovino 10% e a aquisição das mesmas foi realizada no citômetro de fluxo FACSCantoll (BD Bioscience) sendo as análises realizadas por meio do software “FlowJo” (Tree Star, Ashland, OR, EUA). No ensaio de piroptose, adicionou-se iodeto de propídeo (2,5 $\mu\text{g/mL}$) (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, EUA) antes da aquisição das células.

3.18. Atividade de caspase-8. A atividade de caspase-8 no lisado de 2×10^5 células dendríticas primadas com Pam3CSK4 e cultivadas por 24 horas com *P. brasiliensis* 60855 foi mensurada segundo as recomendações do kit *Caspase-Glo 8 Assay kit* (Promega, Madison, WI, EUA). Sumarizando, neste ensaio a intensidade do sinal gerado pela reação de luciferase é proporcional à clivagem do substrato de caspase-8. Após a adição do *Caspase-Glo® 8 Reagent* ao sobrenadante de cultura, na razão de 1:1, a produção de luz em cada amostra foi medida em luminômetro como RLU (*relative light units*).

3.19. Ensaio de formação de poro. O ensaio de formação de poro foi feito pela marcação com brometo de etídeo (EtBr) como descrito anteriormente (KIRBY e

ISBERG, 1998). BMDMs foram cultivados em lâminas de 13mm, em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^5 células por poço. As células foram infectadas por *P. brasiliensis* (MOI5) e centrifugadas a 200 x g por 5 minutos. Após 24 horas, as células aderentes à lâmina foram colocadas em contato com 5 µL de uma solução PBS contendo EtBr (25 µg/mL) e laranja de acridina (5 µg/mL) em uma lâmina de microscopia. Todas as células foram permeáveis ao laranja de acridina, enquanto que somente as células com poro na membrana plasmática permitiram a difusão do EtBr para o seu interior. As imagens foram adquiridas com o microscópio de fluorescência (Olympus America Inc., EUA) e analisadas com o programa ImageJ. A formação de poro foi calculada de acordo com a porcentagem de células permeáveis ao EtBr visualizadas e fotografadas (objetiva de 10x) a partir de 3 diferentes campos que continham cerca de 400 células/campo.

3.20. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH). A porcentagem de morte celular foi mensurada pela atividade da enzima lactato desidrogenase liberada no sobrenadante de macrófagos infectados através do kit *CytoTox96 LDH-release* (Promega). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas do estímulo com *P. brasiliensis* (MOI5) e incubados em temperatura ambiente, por 30 minutos, com uma solução contendo o substrato da enzima. A absorbância da reação colorimétrica foi lida no comprimento de onda de 490 nm e a porcentagem de LDH foi calculada como $(\text{LDH de amostras infectadas} - \text{LDH de amostras não infectadas}) / (\text{LDH da lise total de células} - \text{LDH de amostras não infectadas}) \times 100$. A liberação total de LDH foi determinada a partir da densidade óptica máxima obtida de amostras de células lisadas por 1 hora à 37°C com Triton X-100.

3.21. *Western blotting*. Para o western blotting, 1×10^6 ou 2×10^6 BMDMs ou BMDCs foram plaqueados, respectivamente, em placas de 48 ou 24 poços e infectados por *P. brasiliensis* na proporção 5 fungos/célula por 24 ou 48 horas, conforme indicado em cada figura. Após estes períodos, o lisado celular e o sobrenadante da cultura, separados ou em combinação, foram aquecidos e desnaturados em tampão Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 2,5% β -mercaptoetanol) e, em seguida, fracionadas em SDS-PAGE 15%. As proteínas fracionadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,22 μ m, GE Healthcare) a 10 volts, 400 miliampere por 25 minutos, no *ECL Semi-Dry Transfer Unit* (Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada em TBS-0,1% Tween 20® contendo 5% de leite desnatado (TBS-T-leite) por uma hora a temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-IL-1 β (Sigma-Aldrich; catálogo I3767 ou R&D Systems, AF-401), anti-caspase-1 (Adipogen; clone casper-1), anti-caspase-11 (Sigma-Aldrich; clone 17D9), anti-pró-caspase-8 (Enzo Life Sciences; clone 1G12 or Cell Signaling Technology; #4927), anti-caspase-8 clivada (Cell Signaling Technology; clone D5B2), anti-ASC (Millipore; clone 2EI-7 or Santa Cruz Biotechnology; sc-22514-R) e anti- β -actina (Sigma Aldrich; clone AC15) foram adicionados à membrana em uma diluição de 1:1000 (em TBS-T-leite) e incubados por 16 horas a 4°C. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T-leite por 5 minutos sob agitação. Os anticorpos secundários, conjugados à HRP e diluídos 1:1000 ou 1:3000 em TBS-T-leite, foram incubados com a membrana por uma hora à temperatura ambiente sob agitação. Após três lavagens com TBS-0,1% Tween 20®, a membrana foi incubada com o reagente *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Little Chalfont,

Reino Unido) e as bandas foram reveladas pela exposição da membrana ao aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Em alguns casos, as proteínas do sobrenadante de cultura celular foi precipitado pelo métodos de metanol e clorofórmio.

3.22. Ensaio de oligomerização de ASC. O ensaio de oligomerização de ASC foi realizado segundo (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007), com pequenas modificações (RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, et al., 2012). De forma breve, BMDCs primadas *overnight* com Pam3CSK4 (50ng/mL) (InvivoGen, San Diego, CA, EUA) foram incubadas com o inibidor pan-caspase z-VAD-fmk (25uM) nos 30 minutos precedentes às 24 horas de estímulo com *P. brasiliensis* (Pb60855). O lisado celular citosólico, enriquecido para as frações do inflamassoma pela centrifugação de baixa velocidade, foi submetido ao *cross-linking* com DSS (disuccinimidyl suberate) (2mM). A oligomerização de ASC foi analisada por *immunoblotting*.

3.23. Imunofluorescência. Após a infecção de 24 horas com *P. brasiliensis* (Pb60855), BMDCs foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas, por 30 minutos, com paraformaldeído e bloqueadas, por 1 hora, com soro anti-goat 5% (Dako, Santa Clara, CA, EUA) diluído em tampão Perm/Wash (BD Biosciences). Em seguida, as células foram incubadas *overnight* com anticorpo contra ASC (Millipore, clone 2EI-7) e por mais uma hora com anti-caspase-8 (Cell Signaling Technology #8592). Os anticorpos secundários IgG α -rabbit e α -mouse eram conjugados, respectivamente, com Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 633. O núcleo foi contra-corado com DAPI (Vector Laboratories) e a formação de *specks* pelos componentes do inflamassoma foi visualizada em imagens

capturadas pelo microscópio confocal Leica TCS SP8 localizado na *Research Core Facility* da *University of Massachusetts Medical School*.

3.24. Análise estatística. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD), sendo que foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentavam $p \leq 0,05$. Para comparação entre múltiplos grupos, aplicou-se o teste de análise de variância (two-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey-Kramer. Diferenças nos valores entre dois grupos foram determinadas utilizando o teste t de Student. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. A infecção por *P. brasiliensis* ativa caspase-11 em macrófagos

Recentemente, demonstramos o papel da via canônica de caspase-1 não só no reconhecimento do dano celular induzido pelo fungo, mas também na iniciação de uma resposta Th1 protetora, que via IL-18 promove a defesa antifúngica durante a PCM experimental (KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015). Entretanto, durante a geração inicial de camundongos *Casp1*^{-/-}, no background genético do 129, devido a proximidade dos genes codificantes para caspase-1 e caspase-11, o alelo funcional para caspase-11 também foi perdido (KAYAGAKI *et al.*, 2011). Esse defeito foi mantido, apesar dos vários retrocruzamentos, e isto nos levou a questionar se durante a infecção por *P. brasiliensis*, o fenótipo inicialmente atribuído aos animais *Casp1*^{-/-} seria, de fato, devido à ausência de caspase-1 ou se caspase-11 também poderia estar contribuindo. Partindo desse princípio, decidimos pesquisar em BMDMs WT infectados por *P. brasiliensis* se ocorreria a ativação de caspase-11.

A caspase-11, assim como a caspase-1, está presente no citoplasma de células fagocíticas como um zimogênio inativo de 38 e 43kDa, que precisa ser clivado (~26-30kDa) para adquirir sua função biológica (BROZ, RUBY, *et al.*, 2012; RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, *et al.*, 2012). Pela técnica de *western blotting*, identificamos que ambas as formas, precursora e clivada, foram expressas após o estímulo com *P. brasiliensis*, sendo notório o aparecimento da subunidade p30 na cultura de células infectadas com MOI 5 (**Figura 1A**). Com base nesses resultados podemos afirmar, então, que além da via canônica de caspase-1, a via não canônica de caspase-11 também está operando durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Figura 1. A caspase-11, ativada durante a infecção por *P. brasiliensis*, está relacionada com a formação de poro e liberação de LDH. **(A)** Expressão de caspase-11 no lisado de macrófagos infectados com diferentes MOIs de *P. brasiliensis* por 24 horas. O estímulo de 3 horas com Pam3CSK4 foi utilizado como controle positivo da expressão de caspase-11. **(B)** Macrófagos de camundongos WT, *Casp1/11*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} foram infectados ou não com leveduras viáveis de Pb18 na proporção de 5 fungos/célula. Após 24 horas de cultivo, foi realizada a marcação com laranja de acridina (verde) e brometo de etídeo (vermelho). A formação de poro foi visualizada por microscopia de fluorescência e **(C)** a porcentagem de células permeáveis ao EtBr quantificada e representada através do gráfico de barras. **(D)** BMDMs WT, *Casp1/11*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} foram cultivados na presença ou ausência de *P. brasiliensis*, MOI 5, por 24 horas e a liberação de LDH foi quantificada pelo kit CytoTox96 LDH-release (Promega) a partir do sobrenadante da cultura. Cada barra representa a média ± o desvio padrão do parâmetro em análise. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo (*) indica diferença estatística em relação ao grupo selvagem ($p < 0,05$).

4.2. Caspase-11 é necessária para a formação de poros e liberação de LDH

Da mesma forma que as caspases-1, -4 e -5, a caspase-11 pode, a partir da clivagem do substrato gasdermina-D, iniciar a morte por piroptose (KAYAGAKI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015), promovendo, na célula, a permeabilização da membrana plasmática e a quebra da homeostase intracelular (FINK e COOKSON, 2006; BERGSBAKEN *et al.*, 2009). Como *P. brasiliensis* ativa caspase-11 e esse evento está relacionado com a morte piroptótica de células infectadas (KAYAGAKI *et al.*, 2011; BROZ, RUBY, *et al.*, 2012; RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, *et al.*, 2012; AACHOUI *et al.*, 2013) averiguamos a habilidade de *P. brasiliensis* de inserir poros na membrana, indício desse tipo de morte. Para tal, observamos, com o auxílio de um microscópio de fluorescência, o influxo do corante brometo de etídeo (EtBr) após 24 horas de incubação com o fungo. Os macrófagos com membranas plasmáticas intactas não internalizariam EtBr, enquanto aqueles que tivessem algum tipo de ruptura tornar-se-iam permeáveis a esse corante (MCGAHON *et al.*, 1995). Em combinação com a incorporação de EtBr, adicionamos também à essas células, laranja de acridina: corante verde-acidofílico, não seletivo, que cora tanto células permeáveis como células intactas, permitindo calcular a porcentagem de formação de poro (ZUCKMAN *et al.*, 1999). O cultivo com as leveduras viáveis de *P. brasiliensis* desencadeou a formação de poros na membrana celular de macrófagos provenientes de camundongos WT. Contudo, em BMDMs de camundongos *Casp1/11^{-/-}* e *Casp11^{-/-}* um declínio significativo na permeabilidade ao brometo de etídeo foi observado quando comparado aos selvagens, indicando que poucas células tinham formado poros (**Figuras 1B e 1C**). Assim sendo, podemos deduzir que caspase-1 e 11 são importantes para

a formação de poros. Curiosamente, observamos que quando caspase-1 e 11 foram removidas simultaneamente, a incorporação do corante vermelho foi menor do que quando somente caspase-11 estava ausente, indicando que as duas caspases atuam sinergicamente na formação de poros.

Ainda com a finalidade de estudar esse tipo de morte celular em resposta à *P. brasiliensis*, analisamos a citotoxicidade induzida pelo fungo por meio da quantificação da lactato desidrogenase (LDH), enzima citosólica que é liberada mediante lise celular. Constatamos que macrófagos *Casp11^{-/-}* estimulados com *P. brasiliensis* liberam menos lactato desidrogenase no sobrenadante tanto em relação ao WT como ao duplo *knockout Casp1/11^{-/-}*, o que significa que caspase-1 não tem uma atividade expressiva e marcante no percentual de citotoxicidade (**Figura 1D**).

A necrose também é um tipo de morte celular que é morfologicamente caracterizado pelo rompimento da membrana celular (SCHWEICHEL e MERKER, 1973; CHALLA e CHAN, 2010; MOQUIN e CHAN, 2010). Historicamente, os ensaios de citotoxicidade, que avaliam a morte celular por necrose, determinam o dano na membrana plasmática e são, principalmente, divididos em duas categorias: os que são baseados na absorção diferencial de corantes que não atravessam a membrana íntegra de células vivas, tal como iodeto de propídeo, e aqueles que consistem na detecção de moléculas intracelulares, encontradas extracelularmente devido ao comprometimento da membrana (CHAN *et al.*, 2013). Uma vez que a liberação de LDH é a medida indireta da piroptose, mas também pode indicar necrose combinamos várias metodologias para comprovar que a morte induzida por *P. brasiliensis* é do tipo piroptose.

Examinamos, paralelamente, esse tipo de morte por citometria de fluxo. Tendo em vista que, além da produção de IL-1 β e IL-18, caspase-1 pode acionar vias adicionais que contribuem para o controle da infecção, como a piroptose (FINK e COOKSON, 2006), estipulamos que a dupla marcação para iodeto de propídeo (PI) e para a sonda fluorescente Flica (5-carboxifluorescein-YVAD – FAM-YVAD) (SMOLEWSKI *et al.*, 2001), a qual se liga com alta afinidade à forma ativa da caspase-1, seria um bom indicativo de que as células estariam morrendo por piroptose. Por isso, BMDMs WT e *Casp11*^{-/-} foram colocados em contato 5 fungos por célula e após 24 horas a expressão de caspase-1 ativa em células que tiveram seu DNA intercalado com PI foi determinada. A porcentagem de células Flica+PI+ foi representada por gráfico de pontos (*dot plot*) (**Figura 2A**) e gráfico de barras (**Figura 2B**). A interpretação dos resultados destacou que uma porcentagem significativa de células WT morre pelo fato de ter caspase-1 ativa, haja visto que a frequência de macrófagos duplamente marcados foi superior ao meio (dado não mostrado), demonstrando, assim, que as análises anteriores denotam piroptose. Ao investigar se a morte dependente de caspase-1, deflagrada em macrófagos infectados por *P. brasiliensis*, era direcionada por caspase-11, observamos que a morte celular, mediada por caspase-1, encontrava-se diminuída na ausência de caspase-11, confirmando os resultados obtidos com os ensaios de formação de poro e LDH. Em vista disso, nossos dados apontam que a via não canônica do inflamassoma de caspase-11 é requerida para disparar a morte celular por piroptose em macrófagos infectados por *P. brasiliensis*.

Figura 2. Caspase-11 é necessária para mediar a morte celular por piroptose e para induzir a produção de IL-1α. Macrófagos derivados da medula óssea de animais WT e *Casp11*^{-/-} foram distribuídos em placas de 24 poços e incubados por um período de 24 horas com Pb18 (5 levedura para cada célula) ou meio de cultura. A marcação de caspase-1 ativa foi realizada pela ligação da sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK. Foram consideradas células morrendo por piroptose aquelas que eram positivas para caspase-1 ativa (Flica+) e que incorporaram iodeto de propídeo (PI). **(A)** A expressão dos marcadores e **(B)** a porcentagem de células Flica+PI+ (B) estão representadas por meio dos gráficos acima. **(C)** Quantificação e **(D)** expressão da IL-1β liberada no sobrenadante de cultura de macrófagos WT, *Casp1/11*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} após 48 horas de cultivo com o fungo *P. brasiliensis*. O estímulo de 6 horas com LPS (500ng/mL) e 40 minutos com nigericina (20uM) foi utilizado como controle positivo da secreção da subunidade p17 da IL-1β (E) Macrófagos de camundongos WT, *Casp1/11*^{-/-} e *Casp11*^{-/-} foram estimulados com 5 Pb18 para cada célula e, o sobrenadante, após 48 horas de incubação, foi coletado para dosagem de IL-1α. Esses dados indicam a média ± SD de três poços e são representativos de dois experimentos realizados de maneira independente (*p<0,05 em relação ao WT infectado). NI: não infectado.

4.3. Caspase-11 é dispensável para a secreção de IL-1 β em resposta ao fungo *P. brasiliensis*

A caspase-11 coopera com o inflamassoma de NLRP3 para promover a ativação de caspase-1 e maturação de IL-1 β e IL-18 (KAYAGAKI *et al.*, 2011; CASE *et al.*, 2013; CASSON *et al.*, 2013). Com o propósito de descrever a influência de caspase-11 no inflamassoma de NLRP3, analisamos o envolvimento da via não canônica na secreção de IL-1 β . BMDMs WT, e *Casp11*^{-/-} foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 5) e, após 48 horas de infecção, o sobrenadante da cultura foi utilizado para avaliar a liberação de IL-1 β por ELISA e *western blotting*. Ao contrário da via canônica de caspase-1, que está relacionada com o processamento e secreção de IL-1 β (KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015), a via não canônica de caspase-11 não faz parte deste processo. Mesmo na falta de caspase-11, os macrófagos infectados por *P. brasiliensis* sintetizaram IL-1 β de maneira similar aos macrófagos WT (**Figuras 2C e 2D**). Portanto, concluímos que *P. brasiliensis* induz a expressão de caspase-11 e que a via não canônica de caspase-11 não está envolvida com a produção de IL-1 β .

4.4. A liberação de IL-1 α no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* depende da via não canônica de caspase-11

Da mesma forma que caspase-1 interfere na piroptose, a morte dependente de caspase-11 norteia a liberação de mediadores inflamatórios importantes, tais como IL-1 α (CASE *et al.*, 2013; CASSON *et al.*, 2013). Ao passo que ainda não é evidente como caspase-11 interage com os componentes do inflamassoma para suportar a maturação de IL-1 β e IL-18, em macrófagos *Casp11*^{-/-} incubados com *C. rodentium*, *E. coli*, *V. cholerae*, a

produção de IL-1 α é suprimida (POLTORAK *et al.*, 1998). Logo, é possível que a via não canônica do inflamassoma também colabore com a síntese de IL-1 α frente à infecção por *P. brasiliensis*. Macrófagos foram diferenciados da medula óssea de animais WT, *Casp11^{-/-}* e *Casp11^{-/-}* e, em seguida, infectados por 48 horas com leveduras de *P. brasiliensis* para quantificação de IL-1 α . A via não canônica do inflamassoma de caspase-11 é essencial para garantir a produção de IL-1 α , uma vez que *P. brasiliensis* deixa de ser capaz de induzir a síntese de IL-1 α quando caspase-11 não está presente em macrófagos (**Figura 2E**). Só que apesar da falha na síntese de IL-1 α , a produção não é abolida. Uma substancial quantidade ainda é produzida, o que assinala a existência de uma via independente dessa analisada.

4.5. A síntese de IL-1 α , mediada por caspase-11, confere resistência ao hospedeiro durante a infecção por *P. brasiliensis*

Em seguida, tentamos entender a função biológica da IL-1 α na PCM acompanhando a mortalidade de animais WT e *Il1a^{-/-}* infectados com 2×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Enquanto sete dos dez animais WT permaneceram vivos até o 120º dia de infecção, nenhum dos dez animais *Il1a^{-/-}* infectados por *P. brasiliensis* sobreviveu (**Figura 3A**). Somado a isso, infectamos endovenosamente camundongos WT e *Il1a^{-/-}* com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* e, após 15 e 30 dias, os camundongos foram eutanaziados para a obtenção de fragmentos de pulmão e fígado. A recuperação fúngica dos órgãos foi avaliada pela contagem do número de colônias que cresceram sobre o meio BHI-ágar. No primeiro intervalo de tempo analisado, mais colônias de

Figura 3. Camundongos deficientes de IL-1 α são suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis*. (A) Sobrevida de animais WT e *Il1a*^{-/-} infectados intravenosamente com 2×10^6 formas leveduriformes de Pb18. (B) Carga fúngica pulmonar e hepática de camundongos WT e *Il1a*^{-/-} infectados por 15 e 30 dias com 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*. (C) Seções de 5 μ m de espessura, obtidas de tecido pulmonar parafinado de camundongos WT e *Il1a*^{-/-} infectados durante 30 dias por *P. brasiliensis*, foram oxidadas por ácido crômico e submetidas à impregnação pela prata para visualização do fungo (aumento de 200x). Cada coluna representa a média $\pm$ SD de órgãos obtidos de seis camundongos eutanaziados em dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, em relação ao grupo de animais selvagens (C57BL/6). dpi: dias após a infecção.

P. brasiliensis foram recuperadas do pulmão de animais *Il1a*^{-/-} do que do WT, sendo que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos demais órgãos (**Figura 3B**). No período subsequente os camundongos *Il1a*^{-/-} continuaram com alta carga fúngica pulmonar, só que houve um considerável aumento na quantidade de leveduras encontradas no fígado (**Figura 3B**). Corroborando a contagem do CFU, a coloração pelo método de Gomori também identificou uma frequência superior de leveduras no parênquima pulmonar de animais *Il1a*^{-/-} infectados por 30 dias com *P. brasiliensis* quando comparada com aquela observada em animais WT, indicando que a ausência de IL-1α impede a total remoção do fungo *P. brasiliensis* (**Figura 3C**).

Sabendo que a IL-1α induz a proliferação de macrófagos alveolares CD11b^{low} bem como promove sua diferenciação em CD11b^{high}, processo imprescindível para aumentar a função fagocítica dessa célula e para a formação de granulomas bem organizados em resposta à partículas de sílica (HUAUX *et al.*, 2015), nosso próximo passo foi examinar a lesão granulomatosa em camundongos deficientes de IL-1α infectados por *P. brasiliensis* por 15 e 30 dias. Inesperadamente, nos dois períodos de infecção analisados, o infiltrado inflamatório no pulmão de animais *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* estava organizado como granulomas maduros, bem consolidados, cujos limites eram definidos por uma densa barreira linfocitária situada na porção mais externa (**Figura 4A**). Ademais, nos camundongos *Il1a*^{-/-}, uma grande quantidade de fibras reticulínicas circundava a área periférica das estruturas granulomatosas, compartimentalizando e delimitando as mesmas através de uma firme camada conectiva desenvolvida entre o tecido conjuntivo

Figura 4. O fungo *P. brasiliensis*, em animais *Il1a*^{-/-}, está localizado dentro de granulomas compactos, circundados por fibras de reticulina. **(A)** Lâminas histológicas, coradas por hematoxilina e eosina, foram preparadas a partir de tecido pulmonar proveniente de animais WT e *Il1a*^{-/-} 15 e 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. As imagens foram capturadas com o auxílio de microscópio de luz (aumento 200x). **(B)** Aos 30 dias de infecção, a presença, formação e organização das fibras de reticulina no pulmão de camundongos WT e *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* foram analisadas pelo método de Gomori (aumento de 200x). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. dpi: dias após a infecção.

e o tecido pulmonar circundante (**Figura 4B**). Assim, estes dados mostram que a ausência da IL-1 α , na infecção por *P. brasiliensis*, não atrapalha a formação de granulomas compactos e bem delimitados.

4.6. A liberação de IL-1 α durante a infecção por *P. brasiliensis* previne a inflamação pulmonar

Como o granuloma na PCM experimental é formado por um processo dinâmico que necessita o recrutamento de diversos subtipos celulares, nem sempre sua formação assegura um perfil de resistência à infecção (MOREIRA *et al.*, 2006). Ou seja, uma disfunção e/ou desregulação da resposta imune local aliada à composição irregular, falha na migração e disposição anormal de tais células dentro desta estrutura previnem a proteção do hospedeiro (CANO *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 1998). Em virtude disso, é provável que a suscetibilidade de animais *Il1a*^{-/-} ocorra por problemas de recrutamento celular inadequado e não pela inexistência ou intensa magnitude da resposta inflamatória montada.

Nesse cenário, a mobilização eficiente de neutrófilos (SPERANDIO *et al.*, 2015; PINO-TAMAYO *et al.*, 2016), células que fagocitam e destroem intracelularmente o fungo (MELONI-BRUNERI *et al.*, 1996; PINA *et al.*, 2006), guiando a geração de uma resposta imunológica apropriada (BALDERRAMAS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014), surge como um potencial mecanismo a ser estudado. Para esclarecer, então, se a deficiência de IL-1 α acarretaria em neutropenia, inoculamos 1x10⁶ leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em camundongos WT e *Il1a*^{-/-} e analisamos, por citometria de fluxo, o fenótipo das células recuperadas aos 30 dias de infecção. A população de neutrófilos foi primeiramente selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e

granulosidade (SSC) e, em seguida, analisada quanto à expressão das moléculas de superfície MHCII, CD11b e Ly6G. Conforme pode ser visualizado na **Figura 5A** pelos gráficos de barra, que indicam a proporção e o número absoluto de células, o grupo experimental dos animais *Il1a*^{-/-} apresentou um baixo influxo de polimorfonucleares MHC⁺CD11b⁺Ly6G⁺ quando comparado ao grupo controle. Além disso, pouca expressão do marcador Ly6G foi detectada, por imunohistoquímica, no tecido pulmonar isolado de animais *Il1a*^{-/-} infectados durante 30 dias por *P. brasiliensis* (**Figura 5B**). Coletivamente, estes resultados apontam a IL-1α como uma citocina importante para a quimiotaxia de neutrófilos na PCM experimental.

Dada a influência da IL-1α no recrutamento de neutrófilos nos questionamos se era o prejuízo na resposta do tipo Th17 que impossibilitava a resolução da PCM em camundongos *Il1a*^{-/-}. Seguindo essa linha de raciocínio, observamos que com 30 dias de infecção, a deficiência de IL-1α levou a uma redução nos níveis de IL-17 pulmonar (**Figuras 6A e 6B**), mas não diminuiu a dosagem de IFN-γ (**Figuras 6C e 6D**). De modo semelhante, ao caracterizar, por citometria de fluxo, o infiltrado inflamatório que compunha o parênquima pulmonar de animais *Il1a*^{-/-}, foi visto, no 30º dia de infecção, um decréscimo na frequência e no número de células T CD3⁺CD4⁺IL17⁺ quando comparado ao grupo selvagem (**Figura 6E**).

Durante a infecção por *P. brasiliensis*, o co-cultivo de células TCD4⁺ *não* com macrófagos deficientes de IL-6 atrapalha, *in vitro*, a diferenciação para o perfil Th17 e o decréscimo na síntese de IL-17 agrava a doença em animais *Il6*^{-/-} (TRISTÃO et al., em preparação). Neste sentido, avaliamos os

Figura 5. A IL-1 α acentua a presença de neutrófilos no pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Camundongos WT e *Il1a*^{-/-} foram infectados intravenosamente por 1×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*. **(A)** A análise de citometria de fluxo dos marcadores de neutrófilo foi representada pela frequência e número absoluto de células MHCII⁻ CD11b⁺Ly6G observadas em animais infectados por 30 dias. **(B)** A expressão de Ly6G em fragmentos de pulmão inflados e congelados foi avaliada pela reação de imunohistoquímica (magnificência: x200) no dia 30 após a infecção. Cada barra representa a média $\pm$ o desvio padrão do parâmetro em questão. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, geneticamente modificado versus C57BL/6.

Figura 6. A liberação de IL-1 α induzida pela via não canônica do inflamassoma de caspase-11 atenua a produção da citocina IL-17 desencadeada pela infecção por *P. brasiliensis*. O homogenato pulmonar de animais WT e *Il1a*^{-/-}, desafiados por 30 dias com leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, foi utilizado para avaliar a quantidade de (A e B) IL-17 e (C e D) IFN- γ tanto a nível transcricional como protéico. (E) A frequência e o número absoluto das células T CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ no pulmão de camundondos WT e *Il1a*^{-/-} foi determinado, por citometria de fluxo, depois de 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Cada coluna representa a média de cada parâmetro avaliado $\pm$ desvio padrão. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. *p<0,05, em relação ao grupo de animais selvagens (C57BL/6). FSC: forward scatter.

níveis gênico e protéico da IL-6 em animais *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* durante 30 dias. Como podemos ver na Figura 7, a IL-1α regulou positivamente a produção de IL-6. Em animais *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*, a menor expressão relativa dos transcritos que codificam a citocina IL-6 (**Figura 7A**), foi reproduzida ao quantificar, no homogenato pulmonar, a proteína (**Figura 7B**). Os macrófagos, na PCM experimental, correspondem a 40% das células mielóides produtoras de IL-6 (TRISTÃO et al., em preparação). Suspeitando que uma alteração na principal fonte de IL-6 poderia ser a explicação para os resultados acima mencionados, analisamos a população de macrófagos em animais WT e *Il1a*^{-/-} após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*. A análise de citometria de fluxo demonstrou a presença de um número considerável de células F4/80⁺ no pulmão de animais WT, as quais representavam aproximadamente 30% da população de células MHCII⁺CD11c⁻CD11b⁺. No entanto, de forma contrária, apenas 15% das células do tecido pulmonar de camundongos *Il1a*^{-/-} apresentou positividade para tal marcação (**Figura 7C**). Por isso, em conjunto, esses dados nos permitem afirmar que a IL-1α, sintetizada pela via não canônica de caspase-11, está envolvida com os mecanismos que norteiam a resistência contra a inflamação pulmonar induzida por *P. brasiliensis*.

4.7. Caspase-1 e caspase-11 comandam mecanismos de resistência distintos durante a infecção por *P. brasiliensis*

Partindo do pressuposto que a infecção por *P. brasiliensis* leva a produção de IL-1α em macrófagos, decidimos estudar o papel da caspase-11 na secreção de IL-1α durante a infecção experimental com Pb18. Como não

Figura 7. O prejuízo no perfil de resposta Th17, observado em animais *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*, correlaciona com a menor produção de IL-6. **(A)** O nível de transcritos para a citocina IL-6 foi determinado por qPCR no tecido pulmonar de animais WT e *Il1a*^{-/-} aos 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. A expressão relativa, normalizada pelo gene endógeno β 2-microglobulina, foi calculada comparando-se o nível de mRNA entre os grupos infectado e não infectado. **(B)** Dosagem de IL-6, por ELISA, em amostras de homogenato de pulmão de animais selvagens e geneticamente modificados no dia 30 após a infecção por *P. brasiliensis*. **(C)** Porcentagem e número absoluto de células CD11c⁻ positivas para MHCII, CD11b e F4/80 presentes no pulmão de camundongos WT e *Il1a*^{-/-} infectados durante 30 dias por *P. brasiliensis*. A análise estatística considera a média $\pm$ SD de 5 animais por grupo. Os resultados de um experimento representativo, escolhido dentre outros três, todos realizados independentemente, são apresentados. (*) $p < 0,05$ comparado com o grupo controle WT (C57BL/6).

podemos excluir a contribuição da caspase-1, conduzimos experimentos com animais *Casp1/11^{-/-}*, *Casp11^{-/-}* e *single-knockouts* para caspase-1, os quais foram gerados a partir da devolução do alelo funcional de caspase-11 aos camundongos *Casp1/11^{-/-}* e que daqui em diante serão chamados de *Casp1^{-/-} Casp11^{Tg}* (KAYAGAKI *et al.*, 2011). No dia 30 após a infecção, os lóbulos pulmonares das linhagens em questão foram coletados, homogeneizados e com o sobrenadante dessa mistura realizamos um ELISA para quantificar IL-1 α . Reforçando os achados obtidos com experimentos de cultura de células, os animais deficientes de caspase-11 produziram menos IL-1 α por grama de tecido do que o WT (**Figura 8A**) e mostraram-se incapazes de limitar a infecção por *P. brasiliensis* no 30º dia (**Figura 8B**). De maneira intrigante, notamos que há uma via independente de caspase-11 que também coordena a síntese dessa molécula, visto que ainda encontramos IL-1 α no pulmão de animais *Casp11^{-/-}*. Em contraste, camundongos *Casp1^{-/-} Casp11^{Tg}* e *Casp1/11^{-/-}*, ainda que tenham se comportado de forma semelhante ao C57BL/6 na produção de IL-1 α , foram mais suscetíveis à infecção (**Figura 8B**), sugerindo que a robusta multiplicação de *P. brasiliensis* observada no pulmão de animais *Casp1^{-/-} Casp11^{Tg}* e *Casp1/11^{-/-}* não pode ser explicada pela falta de IL-1 α .

Adicionalmente, camundongos *Casp11^{-/-}* não falharam tanto quanto os *Casp1^{-/-} Casp11^{Tg}* em restringir o crescimento fúngico e apresentaram uma contagem de CFU inferior a dos animais *Casp1/11^{-/-}* (**Figura 8B**), que foi confirmada *in situ* pela coloração de Grocott (**Figura 8C**). Atentando-se para o fato de que camundongos *Casp1/11^{-/-}* possuem um fenótipo muito parecido ao de animais *Casp1^{-/-} Casp11^{Tg}*, inferimos que a suscetibilidade associada à

Figura 8. O clearance de *P. brasiliensis*, no pulmão de animais infectados, requer caspase-11. (A) Camundongos WT e deficientes para caspase-1 e/ou caspase-11 foram infectados intravenosamente com 1×10^6 leveduras viáveis de Pb18. No 30º dia de infecção, os lóbulos pulmonares foram coletados, homogeneizados e a citocina IL-1 α foi quantificada por ELISA. O mesmo macerado foi plaqueado em meio de cultura BHI-ágar e (B) o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi determinado de acordo com a diluição e o peso do órgão. (C) O fungo *P. brasiliensis* foi, também, identificado no pulmão dos respectivos camundongos após a coloração do tecido pelo método de Grocott (aumento de 200x). As barras representam média $\pm$ SD de 6 camundongos. Resultados similares foram obtidos em três experimentos independentes. (*) aponta $p < 0,05$ em comparação aos camundongos WT (C57BL/6) no mesmo período de infecção.

deficiência concomitante de caspase-1 e 11 é decorrente da ausência de caspase-1 e não de caspase-11. Em suma, esses dados sustentam que o inflamassoma de caspase-1 e caspase-11 empregam respostas distintas para conter a replicação de *P. brasiliensis* *in vivo*.

Em adição, a análise de cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina evidenciou, no pulmão de animais *Casp1/11^{-/-}*, *Casp11^{-/-}* e *Casp1^{-/-} Casp11^{Tg}* infectados por *P. brasiliensis*, células fúngicas no interior de granulomas bem formados e bem organizados, sendo escasso o preenchimento do parênquima pulmonar com reação inflamatória difusa (**Figura 9**). Considerando que a inflamação granulomatosa é uma forma de reação de hipersensibilidade do tipo tardio envolvida na proteção contra infecções crônicas (CO *et al.*, 2004), e que animais deficientes de caspase-1 e/ou 11 apresentaram, indiscutivelmente, uma adequada formação de granulomas, podemos sugerir que, durante a infecção por *P. brasiliensis*, a ausência desses membros do inflamassoma atenua, mas não inibe totalmente uma resposta imune celular protetora.

4.8. Caspase-8 contribui para a secreção de IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis*

Com a ideia em mente de que a síntese e o processamento da IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis* dependem parcialmente da caspase-1 (KETELUT-CANEIRO *et al.*, 2015), mas independem da caspase-11, expandimos nossa proposta inicial e incluímos a avaliação da caspase-8, visto que as nossas observações até aqui sugerem a existência de uma via não canônica adicional. Ainda que a maioria dos trabalhos investiguem a regulação

Figura 9. A ausência de caspase-1 e/ou caspase-11 não é deletéria para a formação do granuloma durante a infecção por *P. brasiliensis*. Lâminas de pulmão de animais WT, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} e *Casp1*^{-/-} *Casp11*^{Tg} foram confeccionadas 30 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina e as imagens das lesões granulomatosas capturadas em microscópio de luz (aumento de 200x). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes

da produção de IL-1 β por macrófagos e células dendríticas, focando no papel da caspase-1, enzima que desempenha sua função *downstream* a plataforma molecular do inflamassoma de NLRP3 (RATHINAM, VANAJA E FITZGERALD, 2012; LATZ *et al.*, 2013), estudos recentes destacam a habilidade que a caspase-8 tem de clivar diretamente a pró-forma da IL-1 β bem como de iniciar a ativação de caspase-1 em resposta à diferentes patógenos (MAELFAIT *et al.*, 2008; BOSSALLER *et al.*, 2012; VINCE *et al.*, 2012; UCHIYAMA *et al.*, 2013; SHENDEROV *et al.*, 2014). Contudo, ainda não está estabelecido se caspase-8 é ativada durante a infecção por *P. brasiliensis* e como isso acontece. A caspase-8 é sintetizada como pró-caspase-8 (p55), zimogênio de cadeia simples formado por dois domínios efetores de morte e dos domínios ativos (p18 e p10) (ZHAO *et al.*, 2010). A fim de monitorar a ativação de caspase-8 após a infecção por *P. brasiliensis*, infectamos BMDCs e, após 24 horas, examinamos a presença da subunidade p18 da caspase-8, a qual é produzida mediante a proteólise da pró-caspase (VAN DE CRAEN *et al.*, 1998). Apesar da forte ativação de caspase-1, desencadeada pela adição de *P. brasiliensis* à cultura de células, o processamento da pró-caspase-8 em sua subunidade catalítica (p18) também aumentou marcadamente em células dendríticas primadas com Pam3CSK4 e infectadas subsequentemente com *P. brasiliensis*, o que explica a expressão reduzida de pró-caspase-8 em células WT incubadas com as leveduras de *P. brasiliensis* (**Figura 10A**). Consistente com esses resultados, a atividade de caspase-8, calculada pela luminescência gerada após clivagem do substrato Ac-LETD-pNA, foi proporcional à concentração de fungo utilizada (**Figura 10B**), sugerindo que a caspase-8 integra a via de sinalização acionada pelo reconhecimento de *P. brasiliensis*.

Figura 10. Caspase-8 é proteolicamente processada por células dendríticas durante a infecção por *P. brasiliensis*. (A) BMDCs WT foram primadas com 200 ng mL⁻¹ de Pam3CSK4 por 3 horas e infectadas por *P. brasiliensis* (MOI5) 24 horas antes do lisado e sobrenadante serem coletados e imunoblottados para caspase-8 e caspase-1, respectivamente. Como controle, as células estimuladas previamente com LPS foram incubadas *overnight* com pdAdT (ativador da via canônica do inflamassoma). (B) Atividade de caspase-8 induzida por *P. brasiliensis* em células dendríticas WT pré-tratadas com Pam3CSK4 e submetidas a 24 horas de estimulação com as concentrações indicadas de fungo (MOI 1 e MOI 5). Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os resultados foram representados como unidades relativas de luminescência. Os dados representam a média $\pm$ SD de um experimento feito em triplicata e são representativos de dados obtidos em três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com as células primadas por Pam3CSK4, mas não infectadas por *P. brasiliensis*. MOI: multiplicity of infection; RLU: unidades relativas de luz.

Como na literatura é proposto que caspase-8 está relacionada com a maturação da pró-IL-1 β tanto em resposta a agonistas de TLR3 e TLR4 (MAELFAIT *et al.*, 2008) como após o reconhecimento fúngico por dectina-1 (GRINGHUIS *et al.*, 2012; GANESAN *et al.*, 2014), fomos investigar se caspase-8 estava envolvida na produção de IL-1 β induzida por *P. brasiliensis*. O bloqueio da atividade de caspase-8, por meio do uso de um inibidor químico (z-IETD-fmk), que se liga irreversivelmente a caspase-8 ativa, atenuou significativamente a secreção de IL-1 β ativa após a estimulação com *P. brasiliensis* (**Figura 11A**), o que foi específico a via do inflamassoma, uma vez que a produção de TNF- α permaneceu inalterada (**Figura 11B**). De maneira coerente, observamos também uma diminuição na clivagem da pró-IL-1 β em células tratadas quando comparadas com as não tratadas (**Figura 11C**), demonstrando a importância da caspase-8 no processamento dessa citocina. Em conformidade, percebemos que a inibição de caspase-8 preveniu a citotoxicidade celular, o que resultou na liberação de baixos níveis de LDH, indicativo de permeabilização da membrana plasmática durante a morte celular (**Figura 11D**). Então, esses dados sugerem que o processamento da pró-IL-1 β , após o reconhecimento do fungo *P. brasiliensis*, não é uma consequência exclusiva da ativação da via do inflamassoma canônico de caspase-1, mas também da via do inflamassoma não-canônico de caspase-8.

4.9. A deficiência de caspase-1/11 exacerba a maturação de caspase-8 durante a infecção por *P. brasiliensis*

Nossos resultados revelam que, na falta de caspase-1 e 11, macrófagos infectados por *P. brasiliensis* falham em produzir níveis consideráveis de IL-1 β .

Figura 11. Caspase-8 é importante para o processamento e liberação de IL-1β durante a infecção por *P. brasiliensis*. (A) O sobrenadante de cultura de BMDCs WT, ativadas por 3 horas com Pam3CSK4, tratadas durante as 2 últimas horas com inibidores de caspase-1 (ZYVAD) e caspase-8 (ZIETD) e, subsequentemente, desafiadas por 24 horas com *P. brasiliensis*, foi analisado pela técnica de ELISA para quantificar os níveis de IL-1β e (B) TNF-α. (C) Os inibidores ZYVAD ou ZIETD foram adicionados às células, já anteriormente estimuladas com Pam3CSK4 ou LPS, 2 horas antes da infecção com 5 leveduras de *P. brasiliensis* para cada célula ou da incubação com pdAdT. Após 24 horas e 16 horas, respectivamente, as amostras, preparadas pela combinação de lisado celular e sobrenadante de cultura, foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e marcadas com anticorpo monoclonal pra IL-1β. (D) BMDCs tratadas ou não com Pam3CSK4 foram cultivadas com *P. brasiliensis* para avaliar a quantidade de LDH extracelular. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os valores correspondem a porcentagem de liberação de LDH em relação as células lisadas com Triton X-100. Os dados mostram as médias ± SD de triplicatas. O símbolo (*) indica uma diferença significativa comparada com amostras infectadas por *P. brasiliensis*, porém não tratadas (p < 0,05).

Entretanto, a deficiência de caspase-1 e 11 em BMDMs murinos apenas reduz parcialmente a produção de IL-1 β . Em vista disso, é possível que caspase-8 atue na clivagem da IL-1 β quando as caspases 1 e 11 estão ausentes. Para explorar a verdadeira contribuição da caspase-8 no processo de secreção de IL-1 β , que acontece independentemente de caspase-1/11, analisamos tanto a ativação de caspase-8 como sua atividade enzimática em células dendríticas provenientes de animais *Casp1/11*^{-/-}. Surpreendentemente, o processamento e a atividade de caspase-8 foram potencializados em BMDCs diferenciadas de camundongos *Casp1/11*^{-/-} (**Figuras 12A e 12B**). Isso está de acordo com o papel da caspase-8 de mediar a secreção de IL-1 β em células *Casp1/11*^{-/-}, haja visto que a administração do inibidor de caspase-8 anulou completamente a produção residual de IL-1 β relatada em células dendríticas não tratadas, mas que perderam caspase-1 e 11 (**Figura 13A**). Por outro lado, na mesma condição descrita, o tratamento com z-IETD não interferiu com a produção de TNF- α por BMDCs *Casp1/11*^{-/-} estimuladas por *P. brasiliensis* (**Figura 13B**). Em concordância com a hipótese de que caspase-8 é essencial para a liberação de IL-1 β , quando caspase 1 e 11 não estão presentes a banda correspondente a subunidade p17 da IL-1 β , que já estava nitidamente mais fraca em células dendríticas derivadas de animais *Casp1/11*^{-/-}, desaparece após a adição do inibidor de caspase-8 (**Figura 13C**). Logo, podemos inferir que quando caspase-1 e 11 estão ausentes, a produção de IL-1 β , durante a infecção por *P. brasiliensis*, é desviada para a via não canônica de caspase-8.

Sabendo que caspase-8 é ativada em células dendríticas *Casp1/11*^{-/-} e que ela encontra-se suprimida pelas caspases-1 e 11 em células WT, objetivamos entender se ASC, componente chave para a ativação de caspase-

Figura 12. *P. brasiliensis* ativa caspase-8 na ausência de caspase-1 e 11. (A) BMDCs, provenientes dos animais indicados na figura, foram primeiramente estimuladas com Pam3CSK4 e, em seguida, infectadas, durante 24 horas, com *P. brasiliensis* na concentração de (5:1)(fungo:célula). A ativação de caspase-8 foi analisada por *western blotting* no lisado celular. (B) A atividade de caspase-8 foi determinada pelo kit *Caspase-Glo 8 Assay* (Promega) após 24 horas de estimulação com *P. brasiliensis*. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os resultados foram apresentados como unidades relativas de luz. Os dados são média $\pm$ SD de um dos três experimentos realizados independentemente. (*) simboliza $p < 0,05$ sendo considerado significativo em comparação com o grupo selvagem infectado.

Figura 13. Caspase-8 é responsável pela secreção de IL-1β que acontece de maneira independente do inflamassoma de caspase-1 e 11. (A) BMDs de camundongos WT e *Casp1/11*^{-/-}, estimuladas com Pam3CSK4 e sob efeito do bloqueio de caspase-8, foram colocadas em contato com *P. brasiliensis* (MOI 5). Os níveis de IL-1β e (B) TNF-α foram mensurados por ELISA 24 horas depois. (C) Processamento da IL-1β no extrato total de células dendríticas WT e *Casp1/11*^{-/-} pré-tratadas com Pam3CSK4 e incubadas com 5 leveduras de *P. brasiliensis* por célula no intervalo de 24 horas. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os dados são média ± SD de um dos três experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os símbolos (*) e (#) denotam p < 0,05 sendo considerado significativo em comparação com os grupo WT infectado e tratado com DMSO e *Casp1/11*^{-/-} infectado e tratado com DMSO, respectivamente.

1 frente à infecção por *P. brasiliensis*, também estaria envolvida nesse processo. Ao mesmo tempo que a deleção de ASC dificultou a secreção de IL-1 β (**Figuras 14A e 14B**), a proteólise (**Figura 14C**) e a atividade (**Figura 14D**) de caspase-8 foram estimuladas em células *Asc*^{-/-} infectadas por *P. brasiliensis*. Desse modo, uma vez que a via canônica de caspase-1 inibe a ativação da via não canônica de caspase-8, a produção de IL-1 β induzida por *P. brasiliensis* em células WT é, majoritariamente, conduzida pela caspase-1. Porém, no contexto de deficiência de caspase-1 e 11, a secreção de IL-1 β é mecanisticamente dependente da contribuição da caspase-8.

4.10. Caspase-8 promove o processamento de IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis*

Estabelecido um papel para a caspase-8 na regulação da IL-1 β gerada pelo inflamassoma, buscamos uma evidência genética que certificasse sua função na ativação da via canônica do inflamassoma. Como, em camundongos, a deleção genética de caspase-8 resulta em letalidade embrionária (VARFOLOMEEV *et al.*, 1998), a qual pode ser resgatada pela deleção simultânea da proteína RIP3 (*receptor interacting protein kinase-3*) (KAISER *et al.*, 2011; OBERST *et al.*, 2011), diferenciamos células dendríticas de animais deficientes para caspase-8 no background *Rip3*^{-/-} com o intuito de examinar a liberação de IL-1 β e a ativação de caspase-1 após a infecção por *P. brasiliensis*. Como esperado, a produção de IL-1 β , induzida por *P. brasiliensis* em células WT, diminuiu em células dendríticas *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-} (**Figura 15A**), mas o nível de TNF- α , produzido pelas mesmas, manteve-se comparável ao grupo selvagem (**Figura 15B**). De forma semelhante, uma redução na quantidade de IL-1 β madura, mas não de pró-IL-1 β , foi detectada no extrato

Figura 14. A falta da molécula adaptadora ASC aumenta a ativação da via não canônica de caspase-8 durante a infecção por *P. brasiliensis*. **(A)** A secreção de IL-1β por BMDCs WT e *Asc*^{-/-} estimuladas com Pam3CSK4 e *P. brasiliensis* por 3 e 24 horas, respectivamente, foi determinada por ELISA. **(B)** Células dendríticas estimuladas com Pam3CSK4 foram incubadas com *P. brasiliensis*. Depois de 24 horas a conversão da pró-IL-1β em sua forma biologicamente ativa foi analisada no extrato celular total por *western blotting*. Em paralelo, células WT foram tratadas com LPS e pdAdT como controle. **(C)** A ativação e **(D)** a atividade de caspase-8 foram examinadas em BMDCs de animais WT e *Asc*^{-/-} que já haviam sido estimuladas por 3 horas com Pam3CSK4 e por mais 24 horas com *P. brasiliensis*. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os dados são apresentados como a média ± SD de um experimento representativo realizado três vezes. (*) p < 0,05 comparado com as células dendríticas WT. RLU: unidades relativas de luz.

Figura 15. Caspase-8 medeia a maturação de IL-1 β em resposta a infecção por *P. brasiliensis*. Células dendríticas diferenciadas a partir da medula óssea de camundongos WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-}*Casp8*^{-/-}, estimuladas com Pam3CSK4, foram cultivadas na presença ou ausência de *P. brasiliensis*, MOI 1 e MOI 5. Após 24 horas, a produção de **(A)** IL-1 β e **(B)** TNF- α foi quantificada por ELISA no sobrenadante. **(C)** BMDCs de animais WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-}*Casp8*^{-/-}, primadas ou não com Pam3CSK4, foram deixadas sem infecção ou infectadas por *P. brasiliensis* durante 24 horas. O sobrenadante em conjunto com o lisado celular foi colhido para correr um gel SDS-PAGE e detectar a clivagem da IL-1 β . Quando indicado, BMDCs WT estimuladas por 3 horas com LPS (200ng/mL) e tratadas *overnight* com pdAdT foram utilizadas como controle do experimento. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. A análise estatística considera a média $\pm$ SD de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. Os resultados de um experimento representativo são mostrados. (*) e (#) simbolizam $p < 0,05$ em relação às células dendríticas WT e *Rip3*^{-/-}, respectivamente.

celular de BMDCs *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}* infectadas por *P. brasiliensis* quando comparado com células WT e *Rip3^{-/-}* (**Figura 15C**). No entanto, considerando a função conhecida da caspase-8 como um modulador positivo da transcrição desencadeada pela sinalização de NF- κ B (HU *et al.*, 2000; SU *et al.*, 2005; ALLAM *et al.*, 2014), a quantidade limitada de IL-1 β madura proveniente de células *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}* estimuladas por *P. brasiliensis*, poderia refletir tanto o enfraquecimento da montagem do inflamassoma como a menor disponibilidade de substrato para clivagem. Conforme ilustrado na **Figura 15C**, enquanto os níveis de pró-IL-1 β após o *priming* com Pam3CSK4 estavam intactos em células WT, as células dendríticas sem RIP3 e caspase-8 tinham menos forma precursora de 35kDa. Todavia, como esta diminuição não ocorreu quando as células foram, posteriormente, infectadas por *P. brasiliensis*, concluímos que em vez de atuar no sinal 1, induzindo pró-IL-1 β via NF- κ B, o efeito da caspase-8 é no sinal 2, ou seja, no processamento da pró-IL-1 β . De forma consistente, BMDCs *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}* infectadas por *P. brasiliensis* expressaram níveis normais de pró-caspase-1, porém apresentaram um defeito significativo em ativar caspase-1 quando comparado com as células WT e *Rip3^{-/-}* (**Figura 16A**), o que correlacionou com a menor maturação de caspase-1 em células WT estimuladas com agonista de TLR2 e tratadas com z-IETD-fmk antes do estímulo com *P. brasiliensis* (**Figura 16B**). Para estender nossos achados, avaliamos, adicionalmente, se mesmo com a leve ativação de caspase-1 em células *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}*, a caspase-1 ainda auxiliaria no processamento da IL-1 β . A inibição de caspase-1 limitou claramente a capacidade das células dendríticas *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}* primadas com Pam3CSK4 de produzir IL-1 β madura em resposta à *P. brasiliensis* (**Figuras 17A e 17B**). Logo, estes dados indicam

Figura 16. A ativação eficiente da via canônica do inflamassoma de caspase-1 requer caspase-8. (A) As subunidades p45 e p20 da caspase-1 foram detectadas, respectivamente, no lisado e no sobrenadante coletados de BMDCs WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-} previamente primadas com Pam3CSK4 e infectadas, em seguida, por *P. brasiliensis*. (B) Células dendríticas de animais WT foram estimuladas com 200ng/mL de Pam3CSK4 por 3 horas, sendo que as 2 horas anteriores à adição de *P. brasiliensis* foram na presença ou não de 50uM de ZIETD. O lisado e o sobrenadante precipitado foram imunoblottados para as proteínas indicadas. (C) Oligomerização de ASC no lisado de células dendríticas WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-}, que após serem primadas com Pam3CSK4 e colocadas em contato com *P. brasiliensis* durante 24 horas foi submetido ao enriquecimento com moléculas do inflamassoma e ao *cross-linking* com DSS. Todas as culturas continham o inibidor de caspases ZVAD (25 uM). Os monômeros, dímeros e oligômeros de ASC são assinalados de acordo com o peso molecular dos respectivos agregados. Quando indicado, BMDCs WT estimuladas por 3 horas com LPS (200ng/mL) e tratadas *overnight* com pdAdT foram utilizadas como controle do experimento. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. A análise estatística considera a média ± SD de três experimentos independentes conduzidos em triplicata. Os resultados de um experimento representativo são mostrados. DSS: *disuccinimidyl suberate*.

Figura 17. Na ausência de RIP3 e caspase-8, caspase-1 regula a liberação de IL-1 β induzida por *P. brasiliensis*. BMDCs derivadas de camundongos WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-} foram estimuladas com Pam3CSK4. Após 1 hora, DMSO e ZYVAD (50uM) foram adicionados e mantidos na cultura por 2 horas até o momento da infecção por *P. brasiliensis*. O sobrenadante e o extrato celular completo das células infectadas foram coletados, respectivamente, para **(A)** mensurar, por ELISA, a concentração de IL-1 β secretada e **(B)** para analisar a forma processada da IL-1 β por *western blotting*. Para efeito de controle, as células WT foram transfectadas com pdAdT. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SD de um experimento representativo de outros três. (*) e (#) denota $p < 0,05$ em comparação as células dendríticas tratadas com DMSO e provenientes, respectivamente, de animais *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-}.

caspase-8 licencia a ativação de caspase-1 desencada pelo fungo *P. brasiliensis*, mediando a ativação eficiente da via canônica.

Uma questão chave que surge a partir destes resultados é a forma como a caspase-8 interfere na ativação de caspase-1. Atualmente, acredita-se que dímeros oligomerizados de ASC formem um complexo supramolecular que permite o recrutamento e auto-ativação de caspase-1 (YU *et al.*, 2006; FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007). Nesse caso, uma possibilidade é que a caspase-8 facilita a oligomerização de ASC. A fim de descobrir o estado oligomérico de ASC em células WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-} estimuladas com *P. brasiliensis*, centrifugamos os agregados de ASC foram centrifugados com uma velocidade relativamente baixa e submetidos a uma reação química de *crosslinking*. As moléculas de ASC foi, predominantemente, encontradas como monômeros e dímeros nos *pellets* de BMDCs WT, *Rip3*^{-/-} e *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-}, sendo isoladas em quantidades iguais entre as células WT e *Rip3*^{-/-}. Em contraste, a oligomerização de ASC em células dendríticas *Rip3*^{-/-} *Casp8*^{-/-} infectadas por *P. brasiliensis* foi notavelmente mais fraca (**Figura 16C**). Assim, estes resultados mostram que a caspase-8 é um mediador *upstream* à via canônica do inflamassoma de caspase-1, demonstrando uma interconexão entre estas duas vias de sinalização durante a infecção por *P. brasiliensis*.

4.11. O reconhecimento de *P. brasiliensis* por dectina-1, através da via não canônica de caspase-8, encarrega-se do processamento da IL-1 β

Trabalhos recentes demonstraram que a clivagem de IL-1 β *downstream* ao receptor de lectina do tipo C, dectina-1, em células dendríticas pode prosseguir através de uma via não canônica que envolve a ativação da caspase-8 (GRINGHUIS *et al.*, 2012). Procurando compreender como *P.*

brasiliensis ativa a via não canônica de caspase-8, checamos se dectina-1 via caspase-8 poderia mediar o processamento da pró-IL-1 β . Inicialmente, para assegurar que a clivagem de IL-1 β causada pela infecção por *P. brasiliensis* ocorreria através desse receptor de β -glucana, verificamos a indução e o processamento de IL-1 β em células WT e *Clec7a*^{-/-} após o desafio fúngico. Uma vez que a indução de IL-1 β após a exposição ao *P. brasiliensis* é regulada pela dectina-1 (LOURES *et al.*, 2014), é difícil determinar se este receptor bloqueia o eixo NF- κ B, responsável pelo *priming*, ou os sinais de ativação do inflammasoma. Para excluir o efeito da dectina-1 no acúmulo da pró-IL-1 β e garantir uma produção de pró-IL-1 β independente de dectina-1, as células WT e *Clec7a*^{-/-} foram previamente estimuladas com Pam3CSK4. Embora a dectina-1 também possa desempenhar um papel na etapa de *priming*, agindo *upstream* a via de sinalização do inflamassoma, este receptor de lectina do tipo C é importante para a conversão de pró-IL-1 β em IL-1 β após a infecção por *P. brasiliensis*, visto que houve uma redução na IL-1 β liberada (**Figuras 18A e 18B**). Como hipotetizado, esta falha não foi apenas ocasionada pela regulação positiva defeituosa da pró-IL-1 β , mas também porque a estimulação de células dendríticas *Clec7a*^{-/-} com Pam3CSK4 e *P. brasiliensis* não provocou a ativação de caspase-8 (**Figuras 18C e 18D**).

Após a ligação da β -glucana ao domínio extracelular de reconhecimento de carboidratos da dectina-1, os motivos ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), acoplados à cauda citoplasmática do receptor, são fosforilados pela tirosinas quinases Src, provocando o subsequente recrutamento e

Figura 18. O reconhecimento de *P. brasiliensis* por dectina-1 induz a maturação de IL-1β através da via não canônica de caspase-8. **(A)** Concentração de IL-1β em BMDCs de animais WT e *Clec7a*^{-/-} estimuladas com Pam3CSK4 e diferentes MOIs de *P. brasiliensis* durante 24 horas. **(B)** Western blotting da subunidade p17 da IL-1β no extrato celular total de células dendríticas WT e *Clec7a*^{-/-} estimuladas com Pam3CSK4 e infectadas por *P. brasiliensis*. BMDCs WT estimuladas com LPS e cultivadas com pdAdT overnight foram utilizadas como controle da produção de IL-1β. **(C)** As proteínas do lisado de BMDCs WT e *Clec7a*^{-/-}, estimuladas com Pam3CSK4 e infectadas ou não com *P. brasiliensis*, por 24 horas, foram fracionadas por SDS-PAGE e incubadas com anticorpo que detecta caspase-8. **(D)** A atividade de caspase-8, após 24 horas de incubação com *P. brasiliensis*, foi analisada em células dendríticas selvagens ou deficientes para dectina-1 primadas com Pam3CSK4. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os resultados são representativos de um experimento do total de três realizados. As barras de erro indicam SD das triplicatas. O símbolo (*) indica $p < 0,05$ em relação as células WT (C57BL/6). RLU: unidades relativas de luz.

ativação da tirosina Syk (*spleen tyrosine kinase*) (LEIBUNDGUT-LANDMANN *et al.*, 2007). Nesse sentido, para responder a pergunta se a quinase Syk seria a transdutora de sinal envolvida na secreção de IL-1 β após o reconhecimento de *P. brasiliensis* por dectina-1, células dendríticas WT, primadas com Pam3CSK4, foram tratadas com o inibidor de Syk, piceatanol, antes da adição do fungo à cultura. Ao contrário das culturas controles, tratadas com DMSO, as células WT ativadas com o agonista de TLR2 e que receberam piceatanol antes da infecção por *P. brasiliensis* liberaram quantidades inferiores de IL-1 β (**Figuras 19A e 19B**), suportando a ideia de que o reconhecimento de *P. brasiliensis* induz a produção de IL-1 β através da enzima Syk.

A próxima questão que surgiu foi por que na presença do inibidor de Syk, as células não sustentaram a mesma proporção de clivagem de IL-1 β que as culturas tratadas com DMSO. Como a atividade do inflamassoma é essencial para o processamento dessa citocina, a redução na liberação de IL-1 β poderia retratar o efeito da sinalização de Syk na ativação das caspases 1 e 8. Surpreendentemente, o tratamento de BMDCs WT com piceatanol seguido da incubação com *P. brasiliensis* atenuou a atividade e a ativação de caspase-8 (**Figuras 20A e 20B**), mas também modificou o processamento de caspase-1 (**Figura 20C**), o que pode ser reflexo da interrupção de uma via comum à múltiplos receptores, haja visto que não somente a sinalização de dectina-1 converge para a ativação de Syk. Coletivamente, esses resultados demonstram que a sinalização de Syk é fundamental para a produção de IL-1 β e, durante o reconhecimento de *P. brasiliensis* pelas células do sistema imune inato, suficiente para a ativação de ambas as vias do inflamassoma, a canônica e a não canônica.

Figura 19. A quinase Syk guia a produção de IL-1β durante a infecção por *P. brasiliensis*.

(A) BMDCs selvagens primadas por Pam3CSK4, com ou sem o tratamento do inibidor da quinase Syk (piceatanol 40uM) foram infectadas por leveduras viáveis de *P. brasiliensis* e depois de 24 horas o sobrenadante foi utilizado para monitorar a produção de IL-1β. **(B)** BMDCs de animais selvagens foram infectados por *P. brasiliensis* (MOI 5) por 24 horas na presença ou ausência de 40uM do inibidor de Syk. A combinação do sobrenadante com o lisado celular foi analisada por *immunoblotting* para determinar os níveis de IL-1β liberada. Quando indicado, BMDCs WT estimuladas por 3 horas com LPS (200ng/mL) e tratadas *overnight* com pdAdT foram utilizadas como controle do experimento. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os dados representam a média ± SD da triplicata de poços e são representativos de um dos três experimentos conduzidos independentemente. (*) significa $p < 0,05$ comparado com o grupo WT (C57BL/6) tratado com DMSO.

Figura 20. O processamento da IL-1 β mediado pela quinase Syk está acoplado à ativação das caspases 8 e 1 durante a infecção por *P. brasiliensis*. **(A)** Ensaio para avaliar a atividade de caspase-8 em BMDCs WT estimuladas com *P. brasiliensis* e tratadas ou não com o inibidor de Syk. **(B)** BMDCs de animais WT, primadas com Pam3CSK4, foram pré-tratadas com o inibidor de Syk por 1 hora seguido de 24 horas de infecção por *P. brasiliensis*. As amostras de lisado celular foram utilizadas para marcar caspase-8 e **(C)** pró-caspase-1, enquanto as proteínas do sobrenadante foram precipitadas por metanol e clorofórmio antes de realizar o *western blotting*. Quando indicado, BMDCs WT estimuladas por 3 horas com LPS (200ng/mL) e tratadas *overnight* com pdAdT foram utilizadas como controle do experimento. Todos os experimentos realizados para compor essa figura foram feitos utilizando-se a cepa 60855 de *P. brasiliensis*. Os dados representam a média $\pm$ SD da triplicata de poços e são representativos de um dos três experimentos conduzidos independentemente. (*) significa $p < 0,05$ comparado com o grupo WT (C57BL/6) tratado com DMSO.

Por fim, nosso esforço foi tentar elucidar como a ativação de Syk, desencadeada por dectina-1, conectava-se ao processamento de IL-1 β , mediado por caspase-8, durante a infecção por *P. brasiliensis*. Gringhuis e colaboradores (2012) demonstrou, elegantemente, que, após a sinalização induzida por dectina-1 e Syk, ASC é recrutada para um complexo composto por CARD9-Bcl-10-MALT1-caspase-8 formando uma plataforma de clivagem de pró-IL-1 β , equivalente ao inflamassoma de caspase-1. Supondo que caspase-8 poderia ser recrutada para essa plataforma em resposta à *P. brasiliensis*, coramos ASC e caspase-8 para determinar se caspase-8 formaria um *speck-like* distinto ao de ASC ou se pertenceria ao mesmo *puncta* de ASC. Comparando a distribuição das proteínas marcadas, a análise de imunofluorescência mostrou uma co-localização significativa de caspase-8 e ASC em células dendríticas estimuladas com Pam3CSK4 e *P. brasiliensis* (**Figura 21**). Então, nossa observação coloca a caspase-8 como um componente do complexo do inflammasoma de ASC durante a infecção por *P. brasiliensis*.

Pam3CSK4 + *P. brasiliensis*

Figura 21. Caspase-8 compõe o speck de ASC montado após a infecção por *P. brasiliensis*. Visualização de ASC (verde) e caspase-8 (azul) em fotomicrografias obtidas de BMDCs WT semeadas em lamínulas, primadas com Pam3CSK4 e infectadas por *P. brasiliensis* (cepa 60855) durante 24 horas. DAPI foi utilizado para marcação do núcleo. Escala das barras: 7,5 μm. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A principal via de sinalização envolvida na liberação de IL-1 β é a ativação de caspase-1 pelo inflamassoma clássico ou canônico (FRANCHI, EIGENBROD, *et al.*, 2009). Contudo, descobriu-se recentemente que além da caspase-1 outras caspases, como a caspase-11 e a caspase-8, também estão implicadas no controle do processamento e da maturação da IL-1 β pelo inflamassoma (RATHINAM e FITZGERALD, 2016). A caspase-11 murina, foi descoberta, em 1993, por Yuan e colaboradores (YUAN *et al.*, 1993) a partir da sua similaridade com a caspase-1. Os primeiros estudos *in vitro* realizados com células que superexpressavam caspase-11 demonstravam que essa protease poderia tanto induzir morte celular como se complexar com a caspase-1 (FAUCHEU *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1998).

A região promotora 5'UTR, que regula a expressão do gene da caspase-11, possui múltiplos locais de ligação para NF- κ B e um único sítio de ligação para STAT (SCHAUVLIEGE *et al.*, 2002). Por conseguinte, ativadores dos receptores TLRs e IFNs do tipo I e II, que ativam, respectivamente, NF- κ B e STATs seriam capazes de acelerar a expressão da pró-caspase-11 (SCHAUVLIEGE *et al.*, 2002; KAYAGAKI *et al.*, 2011; RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, *et al.*, 2012; KAYAGAKI *et al.*, 2013; AACHOUI *et al.*, 2015). Relata-se, entretanto, na literatura que a caspase-11 é ativada, de maneira independente de TLR4 (HAGAR *et al.*, 2013; KAYAGAKI *et al.*, 2013), principalmente, em resposta ao lipídio A presente no LPS de várias espécies de bactérias gram-negativas (RATHINAM, VANAJA, WAGGONER, *et al.*, 2012; AACHOUI *et al.*, 2013; HAGAR *et al.*, 2013; KAYAGAKI *et al.*, 2013; MEUNIER *et al.*, 2014; PILLA *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014). De maneira contraditória a

essa ideia, achados convincentes com agentes patogênicos gram-positivos, tais como *Streptococcus pneumoniae* (FANG *et al.*, 2014) e proteinases secretadas pelo fungo *C. albicans* (GABRIELLI *et al.*, 2015) expõem um cenário no qual não só microrganismos, particularmente, bactérias gram-negativas, participam da ativação da via não canônica de caspase-11. Supondo que o papel da caspase-11 também possa ser válido na infecção por *P. brasiliensis* propusemos que a caspase-11 poderia ser uma potencial candidata para a produção residual de IL-1 β por macrófagos *Casp1*^{-/-}. Nosso estudo evidenciou que *P. brasiliensis*, através de um mecanismo ainda obscuro, ativa caspase-11.

Durante mais de uma década, pensou-se que as caspases-1 e 11 desempenhassem papéis redundantes na mesma via de sinalização devido a suposição de que camundongos *Casp1*^{-/-} expressavam caspase-11 normalmente. No entanto, um relato de Kayagaki e colaboradores, em 2011, (KAYAGAKI *et al.*, 2011) lançou uma importante ressalva aos estudos conduzidos com animais *Casp1*^{-/-}. Todas as células embrionárias murinas, de camundongos da linhagem 129, utilizadas para a criação de animais *Casp1*^{-/-} abrigavam uma deleção espontânea de 5 pares de bases, no éxon 7 da caspase-11, responsável por gerar transcritos altamente instáveis. Como consequência, os camundongos originalmente *Casp1*^{-/-} eram *Casp1/11*^{-/-}. Para examinar o papel da caspase-1, os animais *Casp1/11*^{-/-} foram, então, manipulados geneticamente para expressar transgenicamente a caspase-11 e produzir animais *Casp1*^{-/-}*Casp11*^{Tg} (KAYAGAKI *et al.*, 2011). Utilizando linhagens individualmente deficientes para caspase-1, caspase-11 ou para ambas, notamos que, apesar da expressão de caspase-11 pelo transgene não

se equiparar aos níveis dos animais WT (CERQUEIRA *et al.*, 2015), a deficiência de caspase-1 mais do que a de caspase-11 garante o fenótipo de suscetibilidade atribuído aos animais *Casp1/11^{-/-}* infectados por *P. brasiliensis*. Observamos ainda que mesmo com o efeito dominante da caspase-1 na PCM experimental, a caspase-11 participa dos mecanismos que previnem o crescimento de *P. brasiliensis*, seja modulando a polimerização dos filamentos de actina durante a fusão do fagossomo com lisossomo (AKHTER *et al.*, 2012) ou acionando vias programadas de morte como a piroptose (DE GASSART e MARTINON, 2015).

A piroptose foi descrita pela primeira vez em 1992 quando Zychlinsky e colaboradores (ZYCHLINSKY *et al.*, 1992) observaram uma forma lítica de morte celular em macrófagos infectados por *Shigella flexneri*. Demonstrada em macrófagos (FINK e COOKSON, 2006; FINK *et al.*, 2008), células dendríticas (EDGEWORTH *et al.*, 2002), linfócitos (DOITSH *et al.*, 2014), enterócitos (SELLIN *et al.*, 2014) e progenitores hematopoiéticos (Masters *et al.*, 2012), a piroptose é um tipo particular de morte celular induzida por caspase-1 que compartilha características tanto da necrose como da apoptose (COOKSON e BRENNAN, 2001; BERGSBAKEN *et al.*, 2009; LAMKANFI e DIXIT, 2010). O prefixo “pyro”, que em grego significa fogo ou febre, é usado para descrever o marcante e inerente caráter inflamatório gerado pela principal característica desse processo que é o extravasamento do conteúdo intracelular devido à ruptura da membrana plasmática (KUIDA *et al.*, 1995; BRENNAN e COOKSON, 2000; FINK e COOKSON, 2006).

Esta morte foi, inicialmente, denominada apoptose, devido as suas características de fragmentação do DNA, condensação nuclear e dependência

de caspase-1. Mais tarde, no entanto, verificou-se que este tipo de morte, denominada como piroptose em 2001, era distinto da apoptose. A ativação da caspase-1 ou, mais recentemente, da caspase-11 resultava na formação de poros de 1,1 a 2,4 nm de diâmetro na membrana plasmática das células infectadas, tornando-as permeáveis aos corantes de pequeno peso molecular tais como 7-aminoactinomicina (7-AAD), brometo de etídio (EtBr) e iodeto de propídio. De maneira oposta, na apoptose as células fragmentam-se em corpos apoptóticos que por serem mantidos intactos não coram com 7-AAD ou PI (JORGENSEN e MIAO, 2015; SHI *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstram que na infecção *in vitro* por *P. brasiliensis* as células ficam permeáveis ao EtBr, liberam LDH e marcam com PI em condições em que a expressão de caspase-11 é mantida, porém uma participação substancial da caspase-1 é observada em macrófagos de animais *Casp1/11^{-/-}*. Similarmente, o bloqueio da formação de poros na membrana de células infectadas por *C. albicans* (WELLINGTON *et al.*, 2014) suprime a morte piroptótica induzida pela infecção (WELLINGTON *et al.*, 2012; UWAMAHORO *et al.*, 2014).

A perda da integridade na membrana plasmática está associada com a inserção de poros após a clivagem do domínio C-terminal da gasdermina-D (GSDMD) pela caspase-1 (HE *et al.*, 2015; KAYAGAKI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015). Com a eliminação da porção autoinibidora, presente intramolecularmente na região C-terminal da GSDMD, fosfolipídeos ligam-se ao fragmento N-terminal, favorecendo a translocação das moléculas maduras para a camada interna da membrana plasmática, onde formam estruturas arredondas, de aproximadamente 15nm de diâmetro, semelhantes à poros (AGLIETTI *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; SBORGI *et al.*,

2016). A lise da célula, como consequência da alteração no gradiente iônico, do aumento na pressão osmótica e do influxo de água (FINK e COOKSON, 2006; 2007; BERGSBAKE *et al.*, 2009; BRYANT e FITZGERALD, 2009), expõe proteínas citosólicas que, no meio extracelular, podem ser reconhecidas por outras células (LAMKANFI, 2011). Experimentos posteriores irão detalhar melhor a clivagem de GSDMD em células infectadas por *P. brasiliensis* para certificar ainda mais o desencadeamento da morte por piroptose durante a infecção.

Uma questão relevante com esses achados é se a piroptose é benéfica para o hospedeiro, para o fungo *P. brasiliensis* ou para ambos, uma vez que em infecções bacterianas a piroptose de células infectadas remove o nicho protetor, intracelular e replicativo, permitindo que as células efectoras da imunidade inata matem a bactéria (MIAO *et al.*, 2010). Por conta disso, a lise celular impede tanto a sobrevivência do agente invasor dentro do fagolisossomo como aumenta a resposta inflamatória local recrutando fagócitos adicionais. A ativação da piroptose em resposta à *P. brasiliensis*, microrganismo intracelular não obrigatório, pode representar um mecanismo de evasão imunológica. Contudo, considerando que em animais *Casp11^{-/-}* a morte celular está diminuída e a carga fúngica é maior devido ao menor número de neutrófilos e macrófagos, supomos que em nosso modelo experimental a indução de piroptose, pela ativação da via não canônica de caspase-11, contribui para a depuração do fungo *P. brasiliensis*. Embora este conceito seja intuitivamente sadio, as evidências experimentais, que comprovam essa hipótese, são escassas. Como animais *Casp11^{-/-}* infectados por *P. brasiliensis* possuem o inflamassoma canônico de caspase-1 funcional e a caspase-1, por

sua vez, induz a secreção de IL-1 β /IL-18 (KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015), o papel deste tipo de morte celular, na infecção por *P. brasiliensis*, deve ser estudado isoladamente do efeito das citocinas IL-1 β e IL-18, em animais *Il1b^{-/-}* *Il18^{-/-}*.

Uma outra opção é que a liberação de sinais endógenos de perigo, pela morte piroptótica mediada por caspase-11, estimule a ativação do inflamassoma de NLRP3 para que as células adjacentes produzam IL-1 β . Ademais, especula-se que pela diferença temporal entre a formação de poros e a produção de IL-1 β , a piroptose poderia ser o mecanismo pelo qual a IL-1 β seria secretada (FINK e COOKSON, 2006). Em oposição a essa hipótese, observamos que mesmo com a ausência de formação de poros em macrófagos *Casp11^{-/-}* infectados por *P. brasiliensis*, IL-1 β clivada ainda era detectada no sobrenadante de cultura, indicando que a formação de poros não é um pré-requisito essencial para a secreção desta citocina. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que alguns poros formados pela caspase-1 em células *Casp11^{-/-}* sejam suficientes para a secreção de citocinas. Podemos deduzir também a partir destes dados que, sobretudo, caspase-11 é dispensável para a ativação de caspase-1 e que as vias canônica de caspase-1 e não canônica de caspase-11 não agem sinergicamente para liberar IL-1 β .

Em contrapartida, nossos resultados associam a maior suscetibilidade de camundongos *Casp11^{-/-}* aos níveis reduzidos de IL-1 α . Os níveis pulmonares de IL-1 α foram igualmente altos em camundongos *Casp1/11^{-/-}* e *Casp1^{-/-}Casp11^{Tg}*, porém baixos em animais *Casp11^{-/-}*, confirmando que a via canônica de caspase-1 opera na secreção de IL-1 β , enquanto que a produção de IL-1 α é dependente da via não canônica de caspase-11. Intrigados, esse

dato nos fez pensar e querer compreender, futuramente, qual seria o papel da caspase-1 sobre a caspase-11 para que o efeito na produção de IL-1 α fosse perdido e/ou revertido na ausência de caspase-1. Presumimos que a presença de caspase-1 é importante para que a caspase-11 tenha uma função na síntese de IL-1 α e acreditamos que exista uma densa rede de regulação que possa explicar esse fenômeno.

Em alguns modelos infecciosos, a contribuição da IL-1 α , na resposta do hospedeiro *in vivo*, é não redundante em relação a IL-1 β , como é descrito no controle de *Mycobacterium tuberculosis*, *L. pneumophila* e *P. aeruginosa* (GULER et al., 2011; MAYER-BARBER et al., 2011; BARRY et al., 2013; CASSON et al., 2013). Exemplificando, na candidíase sistêmica, a IL-1 α aumenta a atividade antifúngica de leucócitos ao passo que a IL-1 β recruta neutrófilos (VONK et al., 2006). Notoriamente, a perda de IL-1 α , durante a infecção por *P. brasiliensis*, levou à uma exuberante replicação fúngica e a uma inflamação granulomatosa não resolutive. Apoiando esses resultados, frequências significativamente maiores de conídios germinantes de *A. fumigatus* foram encontradas nas vias aéreas de C57BL/6 tratados com anticorpo neutralizante de IL-1 α (CAFFREY et al., 2015).

Em nosso trabalho, observamos que após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis* as fibras reticulínicas do tecido pulmonar de camundongos *Il1a*^{-/-} estavam distribuídas desordenadamente no interior das lesões e em algumas áreas eram encontradas na porção periférica das estruturas granulomatosas, auxiliando na compartimentalização, delimitação e compactação das mesmas. Contrastando esse resultado, di Paolo e colaboradores (2015) definiram um declínio progressivo dos espaços livres presentes nas vias aéreas de

camundongos *Il1a*^{-/-} infectados por *M. tuberculosis*, devido ao preenchimento do parênquima pulmonar por lesões inflamatórias altamente difusas. Considerando, então, que na infecção por *P. brasiliensis* a multiplicação fúngica em animais *Il1a*^{-/-} não é comedida e que a ausência de IL-1 α pouco interfere na arquitetura granulomatosa, estes animais não sucumbem à infecção devido a formação de granulomas frouxos.

Na infecção por *P. brasiliensis*, a inflamação e o influxo de leucócitos, responsáveis pela formação de estruturas granulomatosas, podem também induzir fibrose no tecido pulmonar (RESTREPO *et al.*, 1992; FRANCO *et al.*, 1998; COCK *et al.*, 2000). É sabido que a fibrose é causada por um desarranjo da matriz extracelular, levando à produção excessiva de colágeno (KERR, DE OLIVEIRA, *et al.*, 1988). Diferente do modelo de tuberculose experimental induzido em cobaias em que o processo fibrótico que circunda os granulomas auxilia no controle da infecção, encapsulando e calcificando a lesão, limitando o aparecimento de novos focos inflamatórios e induzindo um estado não replicativo do bacilo (GIL *et al.*, 2010), a evolução das lesões pulmonares para processos fibróticos em pacientes ou camundongos infectados por *P. brasiliensis* acarreta em um quadro de insuficiência pulmonar crônica. Assim, sugerimos que a suscetibilidade de animais *Il1a*^{-/-} durante a PCM possa estar relacionada ao prejuízo no funcionamento pulmonar, decorrente de sequelas fibróticas, ou do recrutamento celular ineficiente.

Favorecendo a segunda opção sabe-se que, durante infecções do trato respiratório, a expressão precoce de IL-1 α por monócitos CCR2⁺ (CAFFREY *et al.*, 2015) precede o recrutamento de neutrófilos para o pulmão (BARRY *et al.*, 2013; CAFFREY *et al.*, 2015) e que o extrato citosólico de células WT

necróticas, mas não de células *Il1a*^{-/-}, induz o recrutamento de neutrófilos via CXCL1/CXCR2 (EIGENBROD *et al.*, 2008). Embora nenhuma diferença tenha sido observada na expressão e produção de CXCL1 (dados não mostrados), averiguamos uma reduzida quimiotaxia de neutrófilos para o pulmão de camundongos *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*. Assim como acontece em modelo de injeção intratraqueal de LPS (DAGVADORJ *et al.*, 2015), uma possibilidade é que na infecção por *P. brasiliensis* a perda de IL-1 α previna o extravasamento dos neutrófilos circulantes para o pulmão como resultado da maior adesão das células ao endotélio vascular pelo aumento de VE-caderina (*vascular endothelial (VE)-cadherin*). Notavelmente, no nosso caso, contudo, outro fator certamente contribui para o menor recrutamento de neutrófilos em animais *Il1a*^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*: a diminuição na produção de IL-17. Na literatura é exposto que células dendríticas estimuladas com *Leishmania amazonensis*, por secretarem mais IL-1 α do que IL-1 β , são menos potentes em produzir IL-12p40 e, por isso, guiam, preferencialmente, as células T CD4⁺ para um perfil IFN- γ ^{low}IL-17^{high} (XIN *et al.*, 2007). Seguindo essa lógica, macrófagos diferenciados com M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) convertem células T CD4⁺ de memória, não comprometidas anteriormente com a produção de IL-17, em células Th17 convencionais (FOUCHER *et al.*, 2015). Nesse mesmo sentido, na esclerose sistêmica, curiosamente, a IL-1 α ligada a Hax-1 ao transloca-se para o núcleo regula a expressão de IL-6 (KAWAGUCHI *et al.*, 2006), o que está de acordo com a associação, demonstrada aqui, entre o comprometimento da resposta Th17 e os baixos níveis de IL-6 no pulmão de camundongos *Il1a*^{-/-} infectados durante 30 dias por *P. brasiliensis*.

Como o inflamassoma é um complexo dinâmico que recruta diferentes componentes para uma plataforma molecular única dependendo do sinal inicial, o surgimento de inflamassomas não canônicos para o processamento da pró-IL-1 β enfatiza a diversidade do sistema imune inato no combate aos patógenos. A caspase-8, descrita primeiramente em 1996, é classicamente conhecida pela sua função como mediadora da via extrínseca da apoptose induzida pelos receptores de morte TNFR1 (TNF-receptor type 1) e CD95 através da proteína FADD (*FAS-associated death domain*) (BOLDIN *et al.*, 1996; MUZIO *et al.*, 1996; ASHKENAZI e DIXIT, 1998). No entanto, inesperadamente, a caspase-8 nem sempre está envolvida na sinalização apoptótica. Evidências substanciais se acumulam em relação às suas funções não apoptóticas, dentre elas a ativação do fator de transcrição NF- κ B (CHAUDHARY *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2000; SU *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2008) e a produção de IL-1 β madura (MAELFAIT *et al.*, 2008). Embora a secreção de IL-1 β coordenada pela ativação da caspase-8 não se restrinja às infecções fúngicas (BOSSALLER *et al.*, 2012; MAN *et al.*, 2013; GURUNG *et al.*, 2014; PHILIP *et al.*, 2014; WENG *et al.*, 2014), dados da literatura reforçam a sua influência na produção de IL-1 β durante as infecções por *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans* (GRINGHUIS *et al.*, 2012; GANESAN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; KARKI *et al.*, 2015). Nosso grupo demonstrou que a produção de IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis* é parcialmente dependente da via canônica de caspase-1 (KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015) e independente da via não canônica de caspase-11. A fim de revelar uma rota alternativa para a secreção de IL-1 β , expandimos nossos objetivos com intuito

de esclarecer a interface entre as vias não canônica de caspase-8 e canônica de caspase-1 após a infecção por *P. brasiliensis*.

Neste trabalho, mostramos que o nível moderado de ativação de caspase-8, observado em células dendríticas WT incubadas com *P. brasiliensis*, é controlado pelas caspases 1 e 11, haja visto que em células Casp1/11 suficientes a expressão destas duas proteases atrapalha a atividade bem como a proteólise da caspase-8. No entanto, na infecção por *P. brasiliensis*, a caspase-8 atuou como uma molécula acessória na indução de IL-1 β em condições em que a ativação da via canônica de caspase-1 era prevenida. Confirmando esses resultados, células dendríticas infectadas por *C. neoformans* também desviam a ativação do inflamassoma para a via de caspase-8 quando caspase-1 está ausente, já que a caspase-1 suprime a ativação da via não canônica de caspase-8 (CHEN *et al.*, 2015). Além disso, a liberação tardia de IL-1 β madura somada ao aumento da expressão da subunidade de 18kDa da caspase-8 após o tratamento prolongado com nigericina também prossegue para a via independente de caspase-1 e 11 (ANTONOPOULOS *et al.*, 2015). Uma possível explicação para a melhora na ativação de caspase-8 em células *Casp1/11*^{-/-} seria que a caspase-8 e as caspases 1 e 11 competem entre si. Consequentemente, a remoção das caspases 1 e 11 assegura que mais ASC esteja disponível para se ligar a pró-caspase-8.

A caspase-8, tal qual as outras caspases, é traduzida como um zimogênio monomérico constituído por um pró-domínio e duas subunidades catalíticas. O pró-domínio dos monômeros de caspase-8 consiste em dois domínios efetores de morte (DEDs) que ao interagirem com o domínio PYRIN

N-terminal de ASC (MASUMOTO *et al.*, 2003; FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007) medeiam a co-localização com o inflammasoma de AIM2 em células infectadas por *F. tularensis* (PIERINI *et al.*, 2012). Através de experimentos de microscopia confocal, encontramos que na infecção por *P. brasiliensis* caspase-8 interage com ASC, colocalizando-se junto com o speck citoplasmático de ASC, em conformidade com publicações anteriores (MASUMOTO *et al.*, 2003; PIERINI *et al.*, 2012; MAN *et al.*, 2013; SAGULENKO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015; KARKI *et al.*, 2015). Em estudos futuros, para entender se os componentes da via canônica do inflamassoma residem nesse mesmo complexo de ASC, investigaremos a distribuição e a orientação espacial de caspase-1 e dos receptores *Nod-like* durante a montagem do inflammasoma de ASC e caspase-8.

Mesmo na presença de caspase-1 e 11, demonstramos que a caspase-8 regula a maturação de IL-1 β na infecção por *P. brasiliensis*. O processamento reduzido de IL-1 β atribuído a inibição farmacológica de caspase-8 foi corroborado usando os camundongos duplo *knockouts* *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}*. A deficiência de caspase-8, mais do que a deficiência de RIP3, perturba a secreção de IL-1 β induzida por *P. brasiliensis* em BMDCs primadas com Pam3CSK4, interrompendo a ativação da caspase-1 e a oligomerização de ASC. A necessidade da caspase-8 para que a caspase-1 fique ativa sugere que a primeira possa estar *upstream* à segunda. Estudos futuros, porém, dissecarão o modo de ação da caspase-8 na tentativa de elucidar se essa protease atua diretamente na caspase-1, participando da mesma via, ou se ela pertence a uma via paralela que converge no inflamassoma canônico de caspase-1 para facilitar a produção de IL-1 β .

Paralelamente, a caspase-8 pode regular a caspase-1 ativando as proteínas celulares inibidoras de apoptose (cIAPs), as quais ao interagirem com a caspase-1, em um complexo em que TRAF2 guia a poliubiquitinação não degradante na lisina 63 da caspase-1, podem favorecer a montagem do inflamassoma ou coordenar sua atividade (LABBE *et al.*, 2011). Ao longo dos últimos anos, vários grupos tem demonstrado o envolvimento da caspase-8 na clivagem da pró-forma da caspase-1 (KARKI *et al.*, 2015; GURUNG *et al.*, 2014; WENG *et al.*, 2014; PHILIP *et al.*, 2014). A exceção é a via de detecção da *Salmonella typhimurium*, em que o processamento da caspase-1 em macrófagos *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}* é preservada (MAN *et al.*, 2013). Estudos mecanísticos descrevem que além da clivagem da IL-1 β , a caspase-8 também regula a síntese do mRNA da pró-IL-1 β (MAN *et al.*, 2013). De fato, a nível transcrricional, a caspase-8 está envolvida com a regulação positiva da pró-IL-1 β , via NF- κ B, em BMDCs estimuladas com LPS (ANTONOPOULOS *et al.*, 2013). Contudo, outra observação constatou que o papel transcrricional da caspase-8 não se resume simplesmente a sinalização induzida por TLR4, estendendo-se a ativação de NF- κ B e MAPK pelo ligante de TLR2 Pam3CSK4 (GURUNG *et al.*, 2014), o que está de acordo com o nosso dado que mostra uma banda mais fraca da forma precursora de 35kDa da IL-1 β em células dendríticas *Rip3^{-/-}Casp8^{-/-}* quando comparadas com as células WT e *Rip3^{-/-}*. Em resposta a *C. albicans* foi estabelecido que as funções catalíticas da produção da caspase-8 bem como a produção de IL-1 β mediada por ela são reguladas por cFLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) (WU *et al.*, 2014). Adicionalmente, a caspase-8 forma um heterodímero com cFLIP (IRMLER *et al.*, 1997) e os fragmentos de cFLIP, oriundos da associação com a caspase-8, estão

envolvidos na ativação de NF- κ B (KATAOKA e TSCHOPP, 2004; GOLKS *et al.*, 2006). Combinado com os nossos resultados, é possível que a proteólise de cFLIP, pré-requisito para a indução da ativação de NF- κ B, não ocorra em células dendríticas deficientes tanto para caspase-8 quanto para RIPK3, o que explicaria o porquê dos níveis de pró-IL-1 β serem baixos após o *priming* com ligante de TLR2. Embora a regulação positiva do gene da IL-1 β pela caspase-8 não seja aplicável ao modelo experimental de infecção por *P. brasiliensis*, investigações adicionais são necessárias para compreender melhor o mecanismo preciso pelo qual a caspase-8 contribui para a eficiente transcrição gênica mediada por NF- κ B.

Em adição, mostramos que a produção de IL-1 β mediada por dectina-1 após o desafio com *P. brasiliensis* requer a via não canônica do inflamassoma de caspase-8, permitindo-nos descobrir uma via ativada por dectina-1 previamente desconhecida em células dendríticas infectadas por *P. brasiliensis*. Realmente, no nosso modelo de infecção fúngica, o receptor dectina-1 está associado a clivagem pós-traducional da pró-IL-1 β , mas alternativamente, também pode regular a transcrição da pró-IL-1 β na fase de *priming* (LOURES *et al.*, 2014). De maneira análoga, o ligante de dectina-1, β -glucana, participa da ativação do inflamassoma de NLRP3 após o *priming* mediado pela ativação de NF- κ B (KUMAR *et al.*, 2009; KANKKUNEN *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que os sinais disparados sozinhos por dectina-1 podem ativar NF- κ B em BMDCs (GROSS *et al.*, 2006; GOODRIDGE *et al.*, 2009), mas não em BMDM, o que se deve ao uso diferencial de CARD9 (GOODRIDGE *et al.*, 2009). Analisando a ativação do inflamassoma por *P. brasiliensis* observamos que a produção de IL-1 β foi amplificada

preferencialmente em células dendríticas. Independentemente da secreção indesejável de IL-1 β em determinadas populações de células mielóides, as células dendríticas quiescentes tem quantidades aumentadas de transcritos de NLRP3 (BAUERNFEIND *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013), em comparação aos macrófagos apresentam uma atividade elevada do promotor de NLRP3 (GUARDA *et al.*, 2011) e o tratamento com GM-CSF maximiza a produção de pró-IL-1 β por ativadores de NF-kB (KHAMENEH *et al.*, 2011), levando-as a atingir um limiar de ativação satisfatório para o inflamassoma de NLRP3.

Vários estudos destacam os mecanismos efetores e reguladores dos PRRs na imunidade inata e adaptativa contra o fungo *P. brasiliensis* (LOURES *et al.*, 2010; LOURES *et al.*, 2011; LOURES *et al.*, 2015). Entretanto, nenhum deles se atentou em determinar a relevância destes receptores na indução e secreção da IL-1 β , provavelmente em virtude das vias compensatórias que parecem mascarar as diferenças imunológicas causadas pelas deficiências dos PRRs. Com base nos nossos resultados, pelo menos uma via adicional é responsável pela indução de pró-IL-1 β em células dendríticas, uma vez que a produção de IL-1 β remanescente perdurou em BMDCs *Clec7a*^{-/-} infectadas por *P. brasiliensis*. Como a dectina-1 manipula a expressão dos receptores do tipo *Toll* durante a PCM (LOURES *et al.*, 2014), e o fungo *P. brasiliensis* é simultaneamente detectado por TLR2 e TLR4 (BONFIM *et al.*, 2009; ACORCI-VALERIO *et al.*, 2010), mais investigações são necessárias para desvendar o papel desses TLRs na produção de IL-1 β .

De maneira interessante, o pré-estímulo com Pam3CSK4 aumentou significativamente esta resposta em comparação ao *priming* com LPS (dados não mostrados), indicando talvez uma expressão mais proeminente da forma

precursora da IL-1 β após o engajamento da sinalização de TLR2 em BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*. De acordo com Netea et al., 2002 (NETEA et al., 2002) a neutralização de TLR2 em células mononucleares, usando um anticorpo específico anti-TLR2, leva a uma redução significativa da produção de TNF- α e IL-1 β após a infecção por *C. albicans*, enquanto que o tratamento com anti-TLR4 não influencia a secreção destas citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, a produção de IL-1 β desencadeada por hifas de *A. fumigatus* em células epiteliais de córnea imortalizadas é mediada por ambas as vias de sinalização, TLR2 e TLR4 (GUO e WU, 2009). No entanto, a síntese de pró-IL-1 β após o reconhecimento de *P. brasiliensis* varia com o tipo celular. Como os níveis transcritos para os genes que codificam os TLRs e a molécula adaptadora MyD88 não estão elevados em BMDCs infectadas por *P. brasiliensis* (TAVARES et al., 2012), a indução de pró-IL-1 β em BMDCs é apenas dependente de da quinase Syk (TAVARES et al., 2013).

Mesmo que a quinase Syk atue na expressão de pró-IL-1 β durante a infecção por *P. brasiliensis*, no presente trabalho também identificamos que ela desempenha uma função fundamental no controle da ativação tanto da via não canônica de caspase-8 como da via canônica de caspase-1, divergindo do estudo desenvolvido por Gringhuis et al. (2012) em que a sinalização de Syk, induzida por *C. albicans* não fagocitada em células dendríticas humanas, estava restrita à atividade de caspase-8. Considerando que a importância de Syk na sinalização de dectina-1 é confinada ao tipo de célula (ROGERS et al., 2005; UNDERHILL et al., 2005), discrepância entre trabalhos distintos pode resultar de variações nas abordagens experimentais ou pode refletir as diferenças do uso de células derivadas de humanos e de murinos.

Outros estudos também associaram o inflamassoma de NLRP3 ao processamento de IL-1 β induzido por Syk em células de camundongos infectadas por fungo (GROSS *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; KANKKUNEN *et al.*, 2010). O mecanismo proposto é que Syk, via dectina-1, aumenta a ativação da via canônica de caspase-1 através da geração de ROS (UNDERHILL *et al.*, 2005; GROSS *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; KANKKUNEN *et al.*, 2010), compostos químicos relevantes para a ativação do inflamassoma de NLRP3 e caspase-1 em células dendríticas infectadas por *P. brasiliensis* (TAVARES *et al.*, 2013). Outro aspecto importante é que Syk representa um ponto comum entre as vias de sinalização de CLEC6A (também conhecido como dectina-2) e CLEC4E (também conhecido como Mincle). Ao contrário da dectina-1, a dectina-2 e a Mincle não possuem *motifs* de sinalização intracelular conhecidos (SATO *et al.*, 2006; YAMASAKI *et al.*, 2008). Em vez disso, associam-se com os *motifs* de ITAM da cadeia γ do receptor de Fc (FcR γ) para propagar o sinal (SATO *et al.*, 2006; BARRETT *et al.*, 2009; ROBINSON *et al.*, 2009; YAMASAKI *et al.*, 2009). Investigações futuras devem elucidar, posteriormente, a necessidade destes receptores durante a PCM. Os novos conhecimentos adquiridos ao decifrar como o reconhecimento de patógenos molda o desenvolvimento de uma resposta imune inata apropriada durante a infecção por *P. brasiliensis* ajuda a permitir uma compreensão mais completa das causas que levam à inflamação prejudicial após as interações hospedeiro-patógeno. Nossos estudos futuros serão dedicados a validar o papel *in vivo* da caspase-8 na PCM experimental.

A caracterização das consequências fisiológicas da ativação de caspase-1, 11 e 8 na infecção por *P. brasiliensis*, bem como seus parceiros na

ativação das vias canônicas e não canônicas do inflamassoma proporciona uma visão mais complexa da composição molecular dos inflammasomas que participam nas respostas do hospedeiro aos fungos. A identificação dessas vias, contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à resistência do hospedeiro e à geração do processo inflamatório em resposta ao fungo *P. brasiliensis*.

Sumário

6. SUMÁRIO

- I. A produção de IL-1 β , durante a infecção por *P. brasiliensis*, é induzida pela ativação da via canônica do inflamassoma de NLRP3-ASC-caspase-1 após o reconhecimento do efluxo de potássio e da acidificação lisossomal;
- II. A citocina IL-18 liberada pela via canônica de caspase-1 protege o hospedeiro da infecção por *P. brasiliensis* induzindo uma resposta protetora do perfil Th1;
- III. A caspase-11, ativada por *P. brasiliensis*, não tem um efeito aditivo na produção de IL-1 β desencadeada pela via canônica de caspase-1, mas é necessária para induzir piroptose e IL-1 α ;
- IV. A IL-1 α , secretada mediante ativação da via não canônica de caspase-11, é importante para o controle *in vivo* da infecção por *P. brasiliensis*, sendo que a resistência conferida por ela está relacionada com a produção de IL-17;
- V. A ativação de caspase-8, após a detecção de *P. brasiliensis* pelo receptor dectina-1, é uma rota alternativa para a secreção de IL-1 β que acontece de maneira independente de caspase-1 e 11;
- VI. A via não canônica de caspase-8, na infecção por *P. brasiliensis*, ao mesmo tempo que auxilia a ativação da via canônica e compõe a plataforma molecular contendo ASC é suprimida pelas caspases-1 e 11.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados concluímos que as vias canônica e não canônica do inflamassoma, atuando individual ou sinergicamente, conectam as respostas imunes inata e adaptativa durante a paracoccidiodomicose experimental. Estando intrinsecamente ligadas à prevenção da patogênese da doença torna-se evolutivamente vantajoso para o hospedeiro ativar múltiplas vias paralelas que induzam a produção de IL-1 β , IL-18 e IL-1 α visto que tais citocinas desempenham um papel crítico na proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*.

—*Mecanismos Propostos*

8. MECANISMOS PROPOSTOS

Figura 22. Crosstalking entre caspases: integração entre as vias de sinalização do inflamassoma para mediar a resposta imune inata do hospedeiro contra *P. brasiliensis*. O efluxo de potássio e a acidificação lisossomal, decorrentes da infecção por *P. brasiliensis*, ativam o sensor citosólico NLRP3, que, através da caspase-1, induz a secreção de IL-18 para controlar a replicação fúngica via IFN-γ. Neste microambiente inflamatório, no entanto, o processamento da pró-IL-1β, que é auxiliado pelo recrutamento da caspase-8 para uma plataforma molecular montada após o reconhecimento do fungo por dectina-1, não conta com a participação da caspase-11. A ativação de caspase-11, em contrapartida, resulta na morte celular por piroptose e na liberação de IL-1α, a qual por meio da síntese de IL-17 medeia resistência à infecção. As vias acionadas de maneira independente de caspase-1 são denominadas como vias não canônicas do inflamassoma. O ponto de interrogação simboliza mecanismo especulativo.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AACHOUI, Y. et al. Canonical Inflammasomes Drive IFN-gamma to Prime Caspase-11 in Defense against a Cytosol-Invasive Bacterium. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 3, p. 320-32, 2015.

AACHOUI, Y. et al. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 975-8, 2013.

ACORCI-VALERIO, M. J. et al. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J Immunol**, v. 71, n. 2, p. 99-108, 2010.

ADACHI, O. et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 143-50, 1998 .

AGLIETTI, R. A. et al. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 28, p. 7858-63, 2016.

AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 319-25, 2004.

AKHTER, A. et al. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 35-47, 2012.

AKIRA, S. Mammalian Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 1, p. 5-11, 2003.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

AKSENTIJEVICH, I. et al. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 12, p. 3340-8, 2002.

ALBANO, A. P. et al. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p. 207-15, 2014.

ALIPRANTIS, A. O. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 736-9, 1999.

- ALLAM, R. et al. Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. **EMBO Rep**, v. 15, n. 9, p. 982-90, 2014.
- ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556-65, 2009.
- ALMEIDA, O. P.; JACKS, J., JR.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 5, p. 377-83, 2003.
- ALNEMRI, E. S. et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 171, 1996.
- AMER, A. et al. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. **J Biol Chem**, v. 281, n. 46, p. 35217-23, 2006 .
- ANDO, M. et al. Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling. **Cancer Sci**, v. 104, n. 8, p. 1002-8, 2013.
- ANDRADE, R. V. et al. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, n. 4, p. 203-12, 2005.
- ANDREI, C. et al. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. **Mol Biol Cell**, v. 10, n. 5, p. 1463-75, 1999.
- ANTONPOULOS, C. et al. Proapoptotic chemotherapeutic drugs induce noncanonical processing and release of IL-1beta via caspase-8 in dendritic cells. **J Immunol**, v. 191, n. 9, p. 4789-803, 2013.
- ANTONPOULOS, C. et al. Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling. **J Biol Chem**, v. 290, n. 33, p. 20167-84, 2015.
- ARAUJO, V. C. et al. Neutrophils in oral paracoccidioidomycosis and the involvement of Nrf2. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76976, 2013.
- AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunol Rev**, v. 223, p. 20-38, 2008.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305-8, 1998.
- ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 25-32, 2004.
- AURON, P. E. et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 24, p. 7907-11, 1984.
- AVERETTE, K.M. et al. Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. :e7913. 2009.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, 2006.

BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-23, 2003.

BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 505-12, 1998.

BALDERRAMAS, H. A. et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. **Cytokine**, v. 67, n. 1, p. 36-43, 2014.

BAO, Q.; SHI, Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 1, p. 56-65, 2007.

BARRETT, N. A. et al. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. **J Immunol**, v. 182, n. 2, p. 1119-28, 2009.

BARROZO, L. V. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 3, p. e643, 2010.

BARROZO, L. V. et al. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 6, p. 1642-9, 2009.

BARRY, K. C. et al. IL-1 α signaling initiates the inflammatory response to virulent *Legionella pneumophila* in vivo. **J Immunol**, v. 190, n. 12, p. 6329-39, 2013.

BAUERNFEIND, F. et al. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4175-81, 2012.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 787-91, 2009.

BAVA, A. J. et al. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. **Microbiol Immunol**, v. 35, n. 3, p. 167-74, 1991.

BELITARDO, D. R. et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2, p. 91-5, 2014.

BELITARDO, D. R. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222-7, 2014.

BELLOCCHIO, S. et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3059-69, 2004.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, 2008.

BENARD, G. et al. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J Infect Dis**, v. 175, n. 5, p. 1263-7, 1997.

BENARD, G. et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-52, 2001.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009.

BIALEK, R. et al. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 9, p. 3190-3, 2000.

BIANCO, F. et al. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 7268-77, 2005.

BIONDO, C. et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 3, p. 870-8, 2005.

BITTENCOURT, J. I.; DE OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Parana, Brazil, 1980/1998. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1856-64, 2005.

BLOTTA, M. H. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 3, p. 390-4, 1999.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1177-91, 2013.

BOCCA, A. L. et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 3056-63, 1998.

BOLDIN, M. P. et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 803-15, 1996.

BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 722-33, 2009.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 80-7, 2002.

BOSSALLER, L. et al. Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 β and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. **J Immunol**, v. 189, n. 12, p. 5508-12, 2012.

BRENNAN, M. A.; COOKSON, B. T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 31-40, 2000.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, 1999.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

BROZ, P. et al. Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 288-91, 2012.

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

BRYAN, N. B. et al. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. **J Immunol**, v. 182, n. 5, p. 3173-82, 2009.

BRYANT, C.; FITZGERALD, K. A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 9, p. 455-64, 2009.

BURCKSTUMMER, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nat Immunol**, v. 10, n. 3, p. 266-72, 2009.

CAFFREY, A. K. et al. IL-1 α signaling is critical for leukocyte recruitment after pulmonary *Aspergillus fumigatus* challenge. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 1, p. e1004625, 2015.

CAI, X. et al. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1207-22, 2014.

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 5, p. 615-23, 1998.

CALICH, V. L. et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 1-7, 2008.

CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p. 175-7, 1979.

CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-94, 1985.

CALLE, D. et al. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiol Infect**, v. 126, n. 2, p. 309-15, 2001.

CALVI, S. A. et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect**, v. 5, n. 2, p. 107-13, 2003.

CANO, L. E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 800-6, 1998.

CARBONELL, L. M. Ultrastructure of dimorphic transformation in paracoccidioides brasiliensis. **J Bacteriol**, v. 100, n. 2, p. 1076-82, 1969.

CARRERO, L. L. et al. New Paracoccidioides brasiliensis isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, 2008.

CARRIE, A. et al. A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. **Nat Genet**, v. 23, n. 1, p. 25-31, 1999.

CARRUTH, L. M.; DEMCZUK, S.; MIZEL, S. B. Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. **J Biol Chem**, v. 266, n. 19, p. 12162-7, 1991.

CASANOVA, J. L.; ABEL, L.; QUINTANA-MURCI, L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 447-91, 2011.

CASE, C. L. et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to Legionella pneumophila. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 5, p. 1851-6, 2013.

CASSON, C. N. et al. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 6, p. e1003400, 2013.

CERQUEIRA, D. M. et al. Caspase-1 but Not Caspase-11 Is Required for NLRC4-Mediated Pyroptosis and Restriction of Infection by Flagellated Legionella Species in Mouse Macrophages and In Vivo. **J Immunol**, v. 195, n. 5, p. 2303-11, 2015.

CHALLA, S.; CHAN, F. K. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 19, p. 3241-53, 2010.

CHAN, F. K.; MORIWAKI, K.; DE ROSA, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Methods Mol Biol**, v. 979, p. 65-70, 2013.

CHAVARRÍA-SMITH, J., VANCE, R.E. Direct proteolytic cleavage of NLRP1B is necessary and sufficient for inflammasome activation by anthrax lethal factor. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 6, p. e1003452, 2013.

CHAUDHARY, P. M. et al. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. **Oncogene**, v. 19, n. 39, p. 4451-60, 2000.

CHEN, G. et al. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 365-98, 2009.

CHEN, M. et al. Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. **J Immunol**, v. 195, n. 10, p. 4962-72, 2015.

CHENG, J. et al. Kinetic properties of ASC protein aggregation in epithelial cells. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 3, p. 738-47, 2010.

CHUANG, T. H.; ULEVITCH, R. J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 3, p. 372-8, 2000.

CISALPINO, P. S. et al. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4553-60, 1996.

CO, D. O. et al. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. **Immunol Lett**, v. 92, n. 1-2, p. 135-42, 2004.

COCK, A. M. et al. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 42, n. 2, p. 59-66, 2000.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol**, v. 49, n. 8, p. 785-98, 2011.

COMPAN, V. et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 487-500, 2012.

CONTI, H. R. et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **J Exp Med**, v. 206, n. 2, p. 299-311, 2009.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 113-4, 2001.

CORVINO, C. L. et al. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 3, p. 483-90, 2007.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002.

CRUZ, C. M. et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. **J Biol Chem**, v. 282, n. 5, p. 2871-9, 2007.

DA SILVA, A. M.; BORBA, C. M.; DE OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v. 37, n. 5-6, p. 165-9, 1994.

DAGVADORJ, J. et al. Lipopolysaccharide Induces Alveolar Macrophage Necrosis via CD14 and the P2X7 Receptor Leading to Interleukin-1alpha Release. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 640-53, 2015.

DE ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248-53, 1971.

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

DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, n. 2, p. 41-8, 2000.

DE FARIAS, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147-52, 2011.

DE GASSART, A.; MARTINON, F. Pyroptosis: Caspase-11 Unlocks the Gates of Death. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 835-7, 2015.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1319, 2015.

DEFAVERI, J.; MARTIN, L. C.; FRANCO, M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. **Mycopathologia**, v. 105, n. 1, p. 53-8, 1989.

DEL NEGRO, G. M. et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 37-46, 2000.

DI PAOLO, N. C. et al. Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. **Immunity**, v. 43, n. 6, p. 1125-36, 2015.

DIAS, M. F.; FILGUEIRA, A. L.; DE SOUZA, W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. **Microsc Microanal**, v. 10, n. 2, p. 215-23, 2004.

DIAS, M. F. et al. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. **Med Mycol**, v. 46, n. 3, p. 241-9, 2008.

DINARELLO, C. A. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 3, p. 483-6, 2000.

DINARELLO, C. A. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. **Semin Nephrol**, v. 27, n. 1, p. 98-114, 2007.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 519-50, 2009.

- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-32, 2011.
- DING, J. et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 111-6, 2016.
- DINIZ, S. N. et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Hum Immunol**, v. 62, n. 8, p. 799-808, 2001.
- DOITSH, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509-14, 2014.
- DOMER, J. E. et al. Immunomodulation in the mycoses. **J Med Vet Mycol**, v. 30 Suppl 1, p. 157-66, 1992.
- DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674-7, 2008.
- DU, X. et al. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 3, p. 362-71, 2000.
- DUBOURDEAU, M. et al. *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3994-4001, 2006.
- DUNCAN, J. A. et al. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. **J Immunol**, v. 182, n. 10, p. 6460-9, 2009.
- DUNNE, A.; O'NEILL, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. **Sci STKE**, v. 2003, n. 171, p. re3, 2003.
- EDGEWORTH, J. D. et al. Cytotoxicity and interleukin-1 β processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 5, p. 1464-71, 2002.
- EDWARDS, M. R. et al. Electron microscopic study of conidia produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 114, n. 3, p. 169-77, 1991.
- EIGENBROD, T. et al. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 α released from dying cells. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8194-8, 2008.
- EISENBARTH, S. C. et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1122-6, 2008.
- ELLIOTT, E. I.; SUTTERWALA, F. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 35-52, 2015.

FANG, R. et al. Type I interferon signaling regulates activation of the absent in melanoma 2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 6, p. 2310-7, 2014.

FAUCHEU, C. et al. A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. **EMBO J**, v. 14, n. 9, p. 1914-22, 1995.

FELDMANN, J. et al. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 1, p. 198-203, 2002.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1590-604, 2007.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 509-13, 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in dairy goats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 95-9, 2013.

FINK, S. L.; BERGSBAKEN, T.; COOKSON, B. T. Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 11, p. 4312-7, 2008.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 1812-25, 2006.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 11, p. 2562-70, 2007.

FONTANA, F. F. et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 159-65, 2010.

FORTES, M. R. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 516-24, 2011.

FOUCHER, E. D. et al. IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1alpha. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 4, p. 1092-102, 2015.

FRANCHI, L. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 576-82, 2006.

FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat Immunol**, v. 10, n. 3, p. 241-7, 2009.

FRANCHI, L. et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 106-28, 2009.

FRANCO, L. et al. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 424-30, 1998.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.

FRANCO, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p. 185-91, 2000.

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 115-49, 1993.

FRANCO, M. D. et al. Regulation of CD2-mediated human T cell activation: anti-CD8 monoclonal antibodies inhibit CD2-mediated rise in intracellular calcium. **Cell Immunol**, v. 152, n. 1, p. 162-75, 1993.

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

FRANKLIN, B. S. et al. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. **Nat Immunol**, v. 15, n. 8, p. 727-37, 2014.

GABRIELLI, E. et al. Induction of caspase-11 by aspartyl proteinases of *Candida albicans* and implication in promoting inflammatory response. **Infect Immun**, v. 83, n. 5, p. 1940-8, 2015.

GANESAN, S. et al. Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1 β production in response to beta-glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 193, n. 5, p. 2519-30, 2014.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-18, 2013.

GAY, N. J.; KEITH, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. **Nature**, v. 351, n. 6325, p. 355-6, 1991.

GEIJTENBEEK, T. B.; GRINGHUIS, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 7, p. 465-79, 2009.

GHAYUR, T. et al. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. **Nature**, v. 386, n. 6625, p. 619-23, 1997.

GIL, O. et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10030, 2010.

GOIHMAN-YAHR, M. et al. Influence of serum on in vitro digestion of *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. **Mycoses**, v. 33, n. 3, p. 111-5, 1990.

GOIHMAN-YAHR, M. et al. Functions of polymorphonuclear leukocytes and individuality of Jorge Lobo's disease: absence of the specific leukocyte digestive defect against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**, v. 32, n. 12, p. 603-8, 1989.

GOIHMAN-YAHR, M. et al. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 28, n. 2, p. 557-66, 1980.

GOIHMAN-YAHR, M. et al. Relationship between digestive and killing abilities of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**, v. 35, n. 11-12, p. 269-74, 1992.

GOIHMAN-YAHR, M. et al. Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. **Mycopathologia**, v. 106, n. 1, p. 53-8, 1989.

GOLKS, A. et al. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. **J Exp Med**, v. 203, n. 5, p. 1295-305, 2006.

GONZALEZ, A. et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2546-52, 2000.

GOODRIDGE, H. S. et al. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. **J Immunol**, v. 182, n. 2, p. 1146-54, 2009.

GRENFELL, S. et al. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human interleukin 1 alpha. **Biochem J**, v. 264, n. 3, p. 813-22, 1989.

GRINGHUIS, S. I. et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. **Nat Immunol**, v. 10, n. 2, p. 203-13, 2009.

GRINGHUIS, S. I. et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nat Immunol**, v. 13, n. 3, p. 246-54, 2012.

GROSS, O. et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 651-6, 2006.

GROSS, O. et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 433-6, 2009.

GROSS, O. et al. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 388-400, 2012.

GU, Y. et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 206-9, 1997.

GUAN, Y. et al. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5094-103, 2010.

GUARDA, G. et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. **J Immunol**, v. 186, n. 4, p. 2529-34, 2011.

GUARRO, J.; GENEJ; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GULER, R. et al. Blocking IL-1alpha but not IL-1beta increases susceptibility to chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1339-46, 2011.

GUO, H.; WU, X. Innate responses of corneal epithelial cells against Aspergillus fumigatus challenge. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 56, n. 1, p. 88-93, Jun 2009.

GURUNG, P. et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. **J Immunol**, v. 192, n. 4, p. 1835-46, 2014.

GURUNG, P. et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon-beta (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. **J Biol Chem**, v. 287, n. 41, p. 34474-83, 2012.

HACHAM, M. et al. Different patterns of interleukin-1alpha and interleukin-1beta expression in organs of normal young and old mice. **Eur Cytokine Netw**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2002.

HAGAR, J. A. et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1250-3, 2013.

HALLAK, J.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 51-62, 1982.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 857-65, 2008.

HAMON, Y. et al. Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 2911-5, 1997.

HARALDSEN, G. et al. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? **Trends Immunol**, v. 30, n. 5, p. 227-33, 2009.

HARDER, J. et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. **J Immunol**, v. 183, n. 9, p. 5823-9, 2009.

HARTON, J. A. et al. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. **J Immunol**, v. 169, n. 8, p. 4088-93, 2002.

HE, W. T. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Res**, v. 25, n. 12, p. 1285-98, 2015.

HE, X. et al. Inflammation and fibrosis during Chlamydia pneumoniae infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5743-54, 2010.

HE, Y.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1 β production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. **J Immunol**, v. 190, n. 1, p. 334-9, 2013.

HEBELER-BARBOSA, F.; MONTENEGRO, M. R.; BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten Paracoccidioides brasiliensis isolates obtained from armadillos (Dasypus novemcinctus). **Med Mycol**, v. 41, n. 2, p. 89-96, 2003.

HEBELER-BARBOSA, F. et al. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PbGP43 genes of Paracoccidioides brasiliensis from patients and armadillos (Dasypus novemcinctus). **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 12, p. 5735-7, 2003.

HELMING, L.; GORDON, S. The molecular basis of macrophage fusion. **Immunobiology**, v. 212, n. 9-10, p. 785-93, 2007.

HERNANDEZ-SANTOS, N.; GAFFEN, S. L. Th17 cells in immunity to Candida albicans. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 5, p. 425-35, 2012.

HERNANDEZ-SANTOS, N. et al. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal Candida albicans infections. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 5, p. 900-10, 2013.

HIBINO, T. et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. **Dev Biol**, v. 300, n. 1, p. 349-65, 2006.

HISE, A. G. et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen Candida albicans. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 5, p. 487-97, 2009.

HOFFMAN, H. M. et al. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nat Genet**, v. 29, n. 3, p. 301-5, 2001.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. **Nat Immunol**, v. 3, n. 2, p. 121-6, 2002.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of Blastomyces dermatitidis that differ in virulence. **Infect Immun**, v. 62, n. 8, p. 3543-6, 1994.

HOGQUIST, K. A.; UNANUE, E. R.; CHAPLIN, D. D. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2181-6, 1991.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514-8, 2009.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 847-56, 2008.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 3749-52, 1999.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

HU, W. H.; JOHNSON, H.; SHU, H. B. Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. **J Biol Chem**, v. 275, n. 15, p. 10838-44, 2000.

HUANG, M. T. et al. Critical role of apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and NLRP3 in causing necrosis and ASC speck formation induced by *Porphyromonas gingivalis* in human cells. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 2395-404, 2009.

HUANG, W. et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. **J Infect Dis**, v. 190, n. 3, p. 624-31, 2004.

HUAUX, F. et al. IL-1alpha induces CD11b(low) alveolar macrophage proliferation and maturation during granuloma formation. **J Pathol**, v. 235, n. 5, p. 698-709, 2015.

IABUKI, K.; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. **Mycopathologia**, v. 67, n. 3, p. 131-41, 1979.

ICHINOHE, T. et al. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. **J Exp Med**, v. 206, n. 1, p. 79-87, 2009.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 404-10, 2010.

INOHARA et al. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p. 355-83, 2005.

INOHARA, N.; NUNEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 371-82, May 2003.

IRMLER, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, v. 388, p. 190-195. 1997

IYER, S. S. et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 311-23, 2013.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 130-42, 2015.

JOUAULT, T. et al. Candida albicans phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. **J Infect Dis**, v. 188, n. 1, p. 165-72, 2003.

JULIANA, C. et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. **J Biol Chem**, v. 287, n. 43, p. 36617-22, 2012.

KAISER, W. J. et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 368-72, 2011.

KAMINAGAKURA, E. et al. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. **Oral Dis**, v. 13, n. 4, p. 434-9, 2007.

KANETSUNA, F. et al. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 110, n. 1, p. 208-18, 1972.

KANETSUNA, F. et al. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 97, n. 3, p. 1036-41, 1969.

KANG, T. B. et al. Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2522-32, 2008.

KANG, T. B. et al. Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 27-40, 2013.

KANKKUNEN, P. et al. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. **J Immunol**, v. 184, n. 11, p. 6335-42, 2010.

KANNEGANTI, T. D. et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 433-43, 2007.

KANNEGANTI, T. D. et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 233-6, 2006.

KARKI, R. et al. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. **Cell Host Microbe**, v. 17, n. 3, p. 357-68, 2015.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 1, p. 89-97, 2000.

KATAOKA, T.; TSCHOPP, J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 7, p. 2627-36, 2004.

KAWAGUCHI, Y. et al. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 39, p. 14501-6, 2006.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666-71, 2015.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117-21, 2011.

KAYAGAKI, N. et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1246-9, 2013.

KETELUT-CARNEIRO, N. et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v.194, n.9, p.4507-17. 2015.

KERR, I. B. et al. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 30, n. 5, p. 336-50, 1988.

KERR, I. B.; DE OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 103, n. 1, p. 11-20, 1988.

KHADER, S. A.; GAFFEN, S. L.; KOLLS, J. K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. **Mucosal Immunol**, v. 2, n. 5, p. 403-11, 2009.

KHAMENEH, H. J. et al. GM-CSF signalling boosts dramatically IL-1 production. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e23025, 2011.

KIM, H. E. et al. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 49, p. 17545-50, 2005.

KIM, S. et al. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 6, p. 1545-51, 2010.

KIRBY, J. E.; ISBERG, R. R. Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. **Trends Microbiol**, v. 6, n. 7, p. 256-8, 1998.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-9, 2007.

KOBAYASHI, Y. et al. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 14, p. 5548-52, 1990.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-76, 2004.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.

- KOSTURA, M. J. et al. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 14, p. 5227-31, 1989.
- KUFER, T. A.; FRITZ, J. H.; PHILPOTT, D. J. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 8, p. 381-8, 2005.
- KUIDA, K. et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. **Science**, v. 267, n. 5206, p. 2000-3, Mar 31 1995.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.
- KUMAR, H. et al. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 8061-7, 2009.
- KURITA, N. et al. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 37, n. 4, p. 261-7, 1999.
- KURITA, N. et al. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 38, n. 2, p. 177-82, 2000.
- KUROKAWA, C. S. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 4, p. 421-8, 2007.
- KURT-JONES, E. A. et al. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 4, p. 1204-8, 1985.
- KURT-JONES, E. A.; VIRGIN, H. W. T.; UNANUE, E. R. Relationship of macrophage Ia and membrane IL 1 expression to antigen presentation. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 3652-4, 1985.
- LABBE, K. et al. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 897-907, 2011.
- LACAZ, C.S.; Paracoccidioidomicose. In LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991, cap. 13, p.248-297.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS – VACCARI E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 1104.
- LALIBERTE, R. E.; EGGLE, J.; GABEL, C. A. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. **J Biol Chem**, v. 274, n. 52, p. 36944-51, 1999.

- LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 3, p. 213-20, 2011.
- LAMKANFI, M. et al. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 4, p. 358-61, 2002.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 95-105, 2009.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 1, p. 44-54, 2010.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, 2014.
- LAMKANFI, M. et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. **J Cell Biol**, v. 187, n. 1, p. 61-70, 2009.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 397-411, 2013.
- LECLERC, M. C.; PHILIPPE, H.; GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 5, p. 331-41, 1994.
- LEE, G. S. et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. **Nature**, v. 492, n. 7427, p. 123-7, 2012.
- LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 8, n. 6, p. 630-8, 2007.
- LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-83, 1996.
- LEVINSOHN, J.L et al. Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. **PLoS Pathog**, v. 8, n.3, p.:e1002638, 2012.
- LIEPINSH, E. et al. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. **J Mol Biol**, v. 332, n. 5, p. 1155-63, 2003.
- LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, 2013.
- LIU, X. et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153-8, 2016.
- LIVONESI, M. C. et al. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2

cytokines during paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 11, n. 1, p. 123-32, 2009.

LIVONESI, M. C. et al. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Med Mycol**, v. 46, n. 7, p. 637-46, 2008.

LOPERA, D. et al. Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 7, p. e1232, 2011.

LOPEZ-CASTEJON, G. et al. Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1beta secretion via assembly of the inflammasome. **J Biol Chem**, v. 288, n. 4, p. 2721-33, 2013.

LOURES, F. V. et al. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Front Microbiol**, v. 6, p. 261, 2015.

LOURES, F. V. et al. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+IL-17+ cells in pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. **J Infect Dis**, v. 210, n. 5, p. 762-73, 2014.

LOURES, F. V. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 1078-88, 2010.

LOURES, F. V. et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1279-90, 2009.

LOURES, F. V. et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2470-80, 2011.

LU, A. et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1193-206, 2014.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, n. 6, p. 931-51, 2005.

LYON, A. C. et al. Serum levels of sTNF-R1, sTNF-R2 and CXCL9 correlate with disease activity in adult type paracoccidioidomycosis. **Acta Trop**, v. 109, n. 3, p. 213-8, 2009.

MACKENZIE, A. et al. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. **Immunity**, v. 15, n. 5, p. 825-35, 2001.

MAELFAIT, J. et al. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. **J Exp Med**, v. 205, n. 9, p. 1967-73, 2008.

MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 20-9, 2005.

MAMONI, R. L. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 40, n. 2, p. 153-9, 2002.

MAN, S. M. et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 20, p. 7403-8, 20 2014.

MAN, S. M. et al. Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1beta production. **J Immunol**, v. 191, n. 10, p. 5239-46, 2013.

MARCH, C. J. et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. **Nature**, v. 315, n. 6021, p. 641-7, 1985.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2007.

MARIATHASAN, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 213-8, 2004.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, 2006.

MARINI, M. M. et al. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BMC Genomics**, v. 11, p. 130, 2010.

MARQUES, A. R. et al. Detection of immune complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 9, p. 1036-40, 2005.

MARQUES MELLO, L.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES, V., JR. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. **Hum Immunol**, v. 63, n. 2, p. 149-54, 2002.

MARQUES, S. A. et al. [Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (Sao Paulo - Brazil)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 25, n. 2, p. 87-92, 1983.

MARTINEZ, J.; HUANG, X.; YANG, Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 14, p. 6442-7, 2010.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 480, 2010.

MARTINON, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 616-9, 2010.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, 2002.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237-41, 2006.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561-74, 2004.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **Trends Immunol**, v. 26, n. 8, p. 447-54, 2005.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 1, p. 10-22, 2007.

MARTY, V. et al. ATP binding cassette transporter ABC1 is required for the release of interleukin-1beta by P2X7-stimulated and lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells. **Glia**, v. 49, n. 4, p. 511-9, 2005.

MASTERS, S. L. et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1009-23, 2012.

MASTERS, S. L. et al. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 621-68, 2009.

MASUMOTO, J. et al. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 303, n. 1, p. 69-73, 2003.

MASUMOTO, J. et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 33835-8, 1999.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

MAYER-BARBER, K. D. et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 1023-34, 2011.

MAZA, P. K. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* induces secretion of IL-6 and IL-8 by lung epithelial cells. Modulation of host cytokine levels by fungal proteases. **Microbes Infect**, v. 14, n. 12, p. 1077-85, 2012.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 153-85, 1995.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, 2001.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, 1997.

MEIER, A. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 561-70, 2003.

MEIXENBERGER, K. et al. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1 β , depending on listeriolysin O and NLRP3. **J Immunol**, v. 184, n. 2, p. 922-30, 2010.

MELONI-BRUNERI, L. H. et al. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J Leukoc Biol**, v. 59, n. 4, p. 526-33, 1996.

MENDES, R.P. The gamut of clinical manifestations of paracoccidioidomycosis. In: FRANCO M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**, Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. p. 233-258.

MEUNIER, E. et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 366-70, 2014.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, 2006.

MIAO, E. A. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 569-75, 2006.

MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nat Immunol**, v. 11, n. 12, p. 1136-42, 2010.

MILLER, A. C. et al. Decreased content of the IL1 α processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after treatment with the benzene metabolite hydroquinone. **Toxicol Lett**, v. 74, n. 2, p. 177-84, 1994.

MISAWA, T. et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, p. 454-60, 2013.

MISHRA, B. B.; GUNDRA, U. M.; TEALE, J. M. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 53, 2008.

MONTENEGRO, M.R.G.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.F.; LACAZ C.S.; RESTREPO A., DEL NEGRO G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. p. 131-150.

MOQUIN, D.; CHAN, F. K. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 8, p. 434-41, 2010.

MOREIRA, A. P. et al. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Pathol**, v. 169, n. 4, p. 1270-81, 2006.

MOREIRA, A. P. V. **Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos**. Boletim Epidemiológico Paulista, 2008.

MOREJON, K. M.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 3, p. 359-66, 2009.

MORIYA, M. et al. Role of charged and hydrophobic residues in the oligomerization of the PYRIN domain of ASC. **Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 575-83, 2005.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 159-64, 1994.

MOSLEY, B. et al. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. **J Biol Chem**, v. 262, n. 7, p. 2941-4, 1987.

MUNOZ-PLANILLO, R. et al. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142-53, 2013.

MURAKAMI, T. et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 28, p. 11282-7, 2012.

MURDOCK, B. J. et al. Early or late IL-10 blockade enhances Th1 and Th17 effector responses and promotes fungal clearance in mice with cryptococcal lung infection. **J Immunol**, v. 193, n. 8, p. 4107-16, 2014.

MURPHY, J. W. et al. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 109-18, 1998.

MURUVE, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. **Nature**, v. 452, n. 7183, p. 103-7, 2008.

MUZIO, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 817-27, 1996.

- NAIFF, R. D. et al. [Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19-27, 1986.
- NAKAMURA, K. et al. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 148-54, 2006.
- NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 423-74, 2001.
- NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 8841-8, 2000.
- NEGRONI, P. [The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina]. **Prensa Med Argent**, v. 53, n. 39, p. 2381-2, 1966.
- NETEA, M. G. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1642-50, 2006.
- NETEA, M. G. et al. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 33, p. 49-77, 2015.
- NETEA, M. G. et al. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J Infect Dis**, v. 185, n. 10, p. 1483-9, 2002.
- NEVEN, B. et al. Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2809-15, 2004.
- NEWORAL, E. P. et al. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 21, n. 5, p. 234-41, 2003.
- NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 11, p. 1028-42, 1999.
- NICKLIN, M. J. et al. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. **Genomics**, v. 79, n. 5, p. 718-25, 2002.
- NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E. Immunohistochemical demonstration of TGF-beta and decorin in paracoccidioidal granulomas. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 8, p. 1073-8, 2003.
- O'CONNOR, W., JR. et al. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6329-33, 2003.

O'NEILL, L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. **Biochem Soc Trans**, v. 28, n. 5, p. 557-63, 2000.

O'NEILL, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. **Immunol Rev**, v. 226, p. 10-8, 2008.

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

OBERST, A. et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 363-7, 2011.

OBERST, A.; GREEN, D. R. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 757-63, 2011.

OGURA, Y.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 659-62, 2006.

OLIVEIRA, G. G. et al. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 299-302, 2013.

OLIVEIRA, G. G. et al. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63-8, 2012.

OLIVEIRA, G. G. et al. Serological evidence of Paracoccidioides brasiliensis infection in chickens from Parana and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, n. 3, p. 197-202, 2011.

OLIVEIRA, S. J. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, v. 4, n. 2, p. 139-44, 2002.

PAGLIARI, C. et al. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. **Microb Pathog**, v. 50, n. 5, p. 263-7, 2011.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am J Dermatopathol**, v. 25, n. 2, p. 107-12, 2003.

PANDIYAN, P. et al. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse Candida albicans Th17 cell infection model. **Immunity**, v. 34, n. 3, p. 422-34, 2011.

PANIAGO, A. M. et al. [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 4, p. 455-9, 2003.

PARISE-FORTES, M. R. et al. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. **Br J Dermatol**, v. 154, n. 4, p. 643-50, 2006.

PARK, S. et al. The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. **J Immunol**, v. 191, n. 8, p. 4358-66, 2013.

PEDRA, J. H.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 1, p. 10-6, 2009.

PEDRA, J. H. et al. ASC/PYCARD and caspase-1 regulate the IL-18/IFN-gamma axis during *Anaplasma phagocytophilum* infection. **J Immunol**, v. 179, n. 7, p. 4783-91, 2007.

PERACOLI, M. T. et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 5, n. 5, p. 413-8, 2003.

PERREGAUX, D.; GABEL, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **J Biol Chem**, v. 269, n. 21, p. 15195-203, 1994.

PETRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1583-9, 2007.

PHILIP, N. H. et al. Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF-kappaB and MAPK signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 20, p. 7385-90, 2014.

PIERINI, R. et al. AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in *Francisella*-infected caspase-1-deficient macrophages. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 10, p. 1709-21, 2012.

PILLA, D. M. et al. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 16, p. 6046-51, 2014.

PINA, A. et al. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 6, p. 1202-13, 2006.

PINO-TAMAYO, P. A. et al. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 3183285, 2016.

PIZZIRANI, C. et al. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3856-64, 2007.

POECK, H. et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 63-9, 2010.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, 1998.

PRADO, M. et al. 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**, v. 104, n. 3, p. 513-21, 2009.

PUCCIA, R. et al. The paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Front Microbiol**, v. 2, p. 257, 2011.

PY, B. F. et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. **Mol Cell**, v. 49, n. 2, p. 331-8, 2013.

QU, Y. et al. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1913-25, 2007.

QURESHI, S. T. et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 615-25, 1999.

RAJAN, J. V. et al. The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection. **J Virol**, v. 85, n. 9, p. 4167-72, 2011.

RAMOS, E. S. M.; SARAIVA LDO, E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, v. 26, n. 2, p. 257-69, vii, 2008.

RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 4, p. 1366-70, 2007.

RATHINAM, V. A.; FITZGERALD, K. A. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 792-800, 2016.

RATHINAM, V. A.; HOAG, K. A.; MANSFIELD, L. S. Dendritic cells from C57BL/6 mice undergo activation and induce Th1-effector cell responses against *Campylobacter jejuni*. **Microbes Infect**, v. 10, n. 12-13, p. 1316-24, 2008.

RATHINAM, V. A.; VANAJA, S. K.; FITZGERALD, K. A. Regulation of inflammasome signaling. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 333-42, 2012.

RATHINAM, V. A. et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 606-19, 2012.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-34, 1985.

RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 29, n. 2, p. 182-97, 2008.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 233-41, 2001.

- RESTREPO, B. I. et al. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **J Med Vet Mycol**, v. 24, n. 4, p. 337-9, 1986.
- RESTREPO, S. et al. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 30, n. 3, p. 173-84, 1992.
- RESTREPO-MORENO, A. *Paracoccidioidomycosis*. In **Clinical Mycology**. DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P.G.; and SOBEL, J.D. New York: Oxford University Press, 2003. p. 328-345.
- RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 379-83, 2004.
- RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol**, v. 46, n. 1, p. 35-40, 2008.
- ROBERTS, T. L. et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1057-60, 2009.
- ROBINSON, M. J. et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. **J Exp Med**, v. 206, n. 9, p. 2037-51, 2009.
- ROBLEDO, M. A. et al. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. **Am Rev Respir Dis**, v. 125, n. 5, p. 563-7, 1982.
- RODRIGUES, D. R. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. **Med Mycol**, v. 45, n. 1, p. 27-33, 2007.
- RODRIGUES, D. R. et al. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Cytokine**, v. 69, n. 1, p. 102-9, 2014.
- ROGERS, N. C. et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 507-17, 2005.
- ROMANO, C. C. et al. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, n. 3, p. 149-57, 2002.
- RUBARTELLI, A. et al. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. **EMBO J**, v. 9, n. 5, p. 1503-10, 1990.
- SAGULENKO, V. et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 9, p. 1149-60, 2013.

SAMSONOFF, W. A. et al. Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 114, n. 1, p. 9-15, 1991.

SAN-BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Curr Top Med Mycol**, v. 1, p. 235-57, 1985.

SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 24, n. 3, p. 267-8, Autumn 1993a.

SAN-BLAS, G. *Paracoccidioidomycosis* and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993b.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and *paracoccidioidomycosis*: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, 2002.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia**, v. 62, n. 2, p. 77-86, 1977.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Molecular aspects of fungal dimorphism. **Crit Rev Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 101-27, 1984.

SANTO, A. H. [Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of Sao Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 23, n. 5, p. 313-24, 2008.

SATO, K. et al. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. **J Biol Chem**, v. 281, n. 50, p. 38854-66, Dec 15 2006.

SBORGI, L. et al. Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 43, p. 13237-42, 2015.

SBORGI, L. et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **EMBO J**, v. 35, n. 16, p. 1766-78, 2016.

SCHAUVLIEGE, R. et al. Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma requires nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1. **J Biol Chem**, v. 277, n. 44, p. 41624-30, 2002.

SCHWANDNER, R. et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. **J Biol Chem**, v. 274, n. 25, p. 17406-9, 1999.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v. 7, n. 3, p. 253-66, 1973.

SELLIN, M. E. et al. Epithelium-intrinsic NAIP/NLRC4 inflammasome drives infected enterocyte expulsion to restrict Salmonella replication in the intestinal mucosa. **Cell Host Microbe**, v. 16, n. 2, p. 237-48, 2014.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **J Cell Biol**, v. 213, n. 6, p. 617-29, 2016.

SHENDEROV, K. et al. Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1beta in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. **J Immunol**, v. 192, n. 5, p. 2029-33, 2014.

SHI, J.; GAO, W.; SHAO, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. **Trends Biochem Sci**, 2016.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660-5, 2015.

SHI, J. et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 187-92, 2014.

SHI, Z. et al. Transcriptional regulation of the novel Toll-like receptor Tlr13. **J Biol Chem**, v. 284, n. 31, p. 20540-7, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHIMADA, K. et al. Caspase-1 dependent IL-1beta secretion is critical for host defense in a mouse model of Chlamydia pneumoniae lung infection. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21477, 2011.

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 401-14, 2012.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 388.

SILVA, G. K. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 191, n. 6, p. 3373-83, 2013.

SILVA, S. S. et al. Insights into the pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis from transcriptome analysis--advances and perspectives. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 249-58, 2008.

SIMÕES, L. B.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. **Med Mycol**, v. 42, n. 6, p. 517-23, 2004.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SIQUEIRA, A. M.; LACAZ, C. S. Serologic characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* E2 antigen. **Braz J Med Biol Res**, v. 24, n. 8, p. 807-13, 1991.

SLACK, J. L. et al. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 275, n. 7, p. 4670-8, 2000.

SMOLEWSKI, P. et al. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p. 73-82, 2001.

SOARES, A. M. et al. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology**, v. 102, n. 4, p. 480-5, 2001.

SOUTO, J. T. et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am J Pathol**, v. 163, n. 2, p. 583-90, 2003.

SOUTO, J. T. et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am. J. Pathol**, v. 163, n. 2, p. 583-590, 2003.

SOUTO, J. T. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1811-20, 2000.

SPERANDIO, F. F. et al. Resistance to *P. brasiliensis* Experimental Infection of Inbred Mice Is Associated with an Efficient Neutrophil Mobilization and Activation by Mediators of Inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 430525, 2015.

STAAL, J.; BEKAERT, T.; BEYAERT, R. Regulation of NF-kappaB signaling by caspases and MALT1 paracaspase. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 40-54, 2011.

STEVENSON, F. T. et al. Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. **J Cell Physiol**, v. 152, n. 2, p. 223-31, 1992.

SU, H. et al. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. **Science**, v. 307, n. 5714, p. 1465-8, 2005.

SUBRAMANIAN, N. et al. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. **Cell**, v. 153, n. 2, p. 348-61, 2013.

SUTTERWALA, F. S. et al. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. **J Exp Med**, v. 204, n. 13, p. 3235-45, 2007.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-51, 1999.

TAKEUCHI, O. et al. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. **J Immunol**, v. 164, n. 2, p. 554-7, 2000.

TAKEUCHI, O. et al. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. **Gene**, v. 231, n. 1-2, p. 59-65, 1999.

TAPIA, F. J. et al. Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. **Histol Histopathol**, v. 6, n. 3, p. 395-402, 1991.

TAVARES, A. H. et al. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1459, 2012.

TAVARES, A. H. et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genet Biol**, v. 81, p. 98-109, 2015.

TAVARES, A. H. et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2595, 2013.

TAVIAN, E. G. et al. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Cytokine**, v. 41, n. 1, p. 48-53, 2008.

TAYLOR, S. L. et al. Genomic organization of the interleukin-1 locus. **Genomics**, v. 79, n. 5, p. 726-33, 2002.

TEIXEIRA MDE, M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol**, v. 52, n. 1, p. 19-28, 2014.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, 2009.

THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol**, v. 43, n. 8, p. 725-9, 2005.

THEODORO, R. C. et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

THOMAS, P. G. et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 566-75, 2009.

THOME, M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 5, p. 348-59, 2004.

- THORNBERRY, N. A. et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 768-74, 1992.
- TING, J. P. et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 285-7, 2008.
- TOBON, A. M. et al. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clin Infect Dis**, v. 37, n. 7, p. 898-904, 2003.
- TOMA, C. et al. Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5287-97, 2010.
- TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 317-43, 1993.
- TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 210-5, 2010.
- TSUTSUI, H. et al. Induction of allergic inflammation by interleukin-18 in experimental animal models. **Immunol Rev**, v. 202, p. 115-38, 2004.
- UCHIYAMA, R.; YONEHARA, S.; TSUTSUI, H. Fas-mediated inflammatory response in *Listeria monocytogenes* infection. **J Immunol**, v. 190, n. 8, p. 4245-54, 2013.
- UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811-5, 1999.
- UNDERHILL, D. M. et al. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2543-50, 2005.
- UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812-21, 2004.
- UWAMAHORO, N. et al. The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00003-14, 2014.
- VALLE, A.C.F; COSTA, R.B.L. Paracoccidioidomycose. In BATISTA, R.S.; IGREJA, R.P; GOMES, A.D.; HUGGINS, D.W. **Medicina tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p.934-958.
- VAN DE CRAEN, M. et al. Molecular cloning and identification of murine caspase-8. **J Mol Biol**, v. 284, n. 4, p. 1017-26, 1998.

- VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. **Shock**, v. 34, n. 4, p. 407-11, 2010.
- VARFOLOMEEV, E. E. et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. **Immunity**, v. 9, n. 2, p. 267-76, 1998.
- VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, n. 3, p. 131-3, 1998.
- VERLI, F. D. et al. [Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of Sao Lucas Hospital, Pontificia Universidade Catolica of Rio Grande do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 3, p. 234-7, 2005.
- VINCE, J. E. et al. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. **Immunity**, v. 36, n. 2, p. 215-27, 2012.
- VONK, A. G. et al. Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. **J Infect Dis**, v. 193, n. 10, p. 1419-26, 2006.
- VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2163-96, 2012.
- WANG, S. et al. Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1beta converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. **J Biol Chem**, v. 271, n. 34, p. 20580-7, 1996.
- WANG, S. et al. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 501-9, 1998.
- WANG, Y. et al. Cellular localization of NLRP3 inflammasome. **Protein Cell**, v. 4, n. 6, p. 425-31, 2013.
- WARREN, M. K.; VOGEL, S. N. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. **J Immunol**, v. 134, n. 2, p. 982-9, 1985.
- WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci Signal**, v. 3, n. 105, p. cm1, 2010.
- WELLINGTON, M.; KOSELYN, K.; KRYSAN, D. J. *Candida albicans* morphogenesis is not required for macrophage interleukin 1beta production. **MBio**, v. 4, n. 1, p. e00433-12, 2012.
- WELLINGTON, M. et al. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 2, p. 329-40, 2014.

- WENG, D. et al. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 20, p. 7391-6, 2014.
- WERMAN, A. et al. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 8, p. 2434-9, 2004.
- WILMANSKI, J. M.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; KOBAYASHI, K. S. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 1, p. 13-30, 2008.
- WU, Y. H. et al. Participation of c-FLIP in NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 3, p. 451-61, 2014.
- XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming Leishmania amazonensis-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 5018-26, 2007.
- YAMASAKI, S. et al. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 10, p. 1179-88, 2008.
- YAMASAKI, S. et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, Malassezia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 6, p. 1897-902, 2009.
- YANG, R. B. et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 284-8, 1998.
- YAROVINSKY, F. et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626-9, 2005.
- YAUCH, L. E. et al. 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**, v. 72, n. 9, p. 5373-82, 2004.
- YE, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J Exp Med**, v. 194, n. 4, p. 519-27, 2001.
- YU, J. J.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. **Front Biosci**, v. 13, p. 170-7, 2008.
- YU, J. W. et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 2, p. 236-49, 2006.
- YUAN, J. et al. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 641-52, 1993.
- ZAMBETTI, L. P. et al. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation...and a lot more. **Immunol Res**, v. 53, n. 1-3, p. 78-90, 2012.

ZELANTE, T. et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 10, p. 2695-706, 2007.

ZHAO, Y.; SUI, X.; REN, H. From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8. **J Cell Physiol**, v. 225, n. 2, p. 316-20, 2010.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221-5, 2011.

ZHOU, X. et al. The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1beta from macrophages but not from monocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 291, n. 3, p. 598-604, 2002.

ZOU, H. et al. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J Biol Chem**, v. 274, n. 17, p. 11549-56, 1999.

ZUCKMAN, D. M.; HUNG, J. B.; ROY, C. R. Pore-forming activity is not sufficient for Legionella pneumophila phagosome trafficking and intracellular growth. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 5, p. 990-1001, 1999.

ZYCHLINSKY, A.; PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. **Nature**, v. 358, n. 6382, p. 167-9, 1992.

Anexos

10. ANEXOS

Anexo 1: Sequência de primers

Tabela 1. Sequência de *primers* murinos utilizados nas reações de qPCR

Gene	Sequência sense (5'-3')	Sequência anti-sense (5'-3')
<i>β2m</i>	CACCCCCACTGAGACTGATACATA	TCACATGTCTCGATCCCAGTAGA
<i>Ifng</i>	CATGGCTGTTTCTGGCTGTTAC	CCAGTTCCTCCAGATATCCAAGA
<i>Il17a</i>	GGACTCTCCACCGCAATGA	GCACTGAGCTTCCCAGATCAC
<i>Il6</i>	AAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCT	TTTACCTCTTGGTTGAAGATATGAA

Anexo 2: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP
3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 001/2014, sobre o projeto intitulado “*Papel do inflamassoma canônico e não canônico na modulação da resposta imune inata durante a infecção por Paracoccidioides brasiliensis*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor João Santana da Silva** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de fevereiro de 2014.

We certify that the protocol nº 001/2014, entitled “*Role of canonical and non-canonical inflammasome in modulating the innate immune response during infection with Paracoccidioides brasiliensis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 02/26/2014.

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício