



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CARINA ZERBETTO SEGATO

**INTERLEUCINA-17 É PRODUZIDA DEVIDO A APOPTOSE  
INDUZIDA POR ASPARTATO PROTEASE 9 DE *CANDIDA  
ALBICANS***

CARINA ZERBETTO SEGATO

**INTERLEUCINA-17 É PRODUZIDA DEVIDO A APOPTOSE  
INDUZIDA POR ASPARTATO PROTEASE 9 DE *CANDIDA*  
*ALBICANS***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção o título de Mestre em Patologia Experimental

Orientador: Profa. Dra. Ionice Felipe

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S454i Segato, Carina Zerbetto.  
Interleucina-17 é produzida devido a apoptose induzida por Aspartato  
Protease 9 de *Candida albicans* / Carina Zerbetto Segato. –  
Londrina, 2014.  
73 f. : il.

Orientador: Ionice Felipe.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* – Teses. 2. Resposta imune – Teses. 3. Apoptose  
– Teses. 4. Citocinas – Teses. 5. Camundongo como animal de  
laboratório – Teses. I. Felipe, Ionice. II. Universidade Estadual de  
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação  
em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

CARINA ZERBETTO SEGATO

**INTERLEUCINA-17 É PRODUZIDA DEVIDO A APOPTOSE INDUZIDA  
POR ASPARTATO PROTEASE 9 DE *CANDIDA ALBICANS***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção o título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Ionice Felipe

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Ionice Felipe  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Ricardo S. Couto de Almeida  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho aos pequenos Benjamin e Ayla  
Pelos incontáveis momentos de alegria e diversão que me proporcionam.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, acima de todas as coisas, por me capacitar e renovar minhas forças a cada novo dia;

À professora Dra. Ionice Felipe por ter me recebido em seu laboratório, por toda a paciência e compreensão, e por ter compartilhado seus conhecimentos e experiências de vida enquanto me orientava neste trabalho;

Aos professores Ricardo S. Couto de Almeida, Ivete Conchon Costa e Waldiceu Ap. Verri Jr. por aceitarem fazer parte desta banca examinadora e pelas preciosas contribuições, não apenas agora, mas durante todo o percurso até chegarmos aqui;

Aos meus pais Ismaél e Ivete por sempre me incentivarem a estudar e buscar uma formação de qualidade, tanto profissional quanto pessoal, e pelo exemplo de perseverança, honestidade e respeito;

Aos meus irmãos Tiago e Bruna, pela companhia sempre agradável e pelos momentos de descontração e boas risadas;

Ao meu marido Lucas, por ser meu companheiro a cada novo desafio, por sempre me encorajar a continuar buscando crescimento e por cuidar de mim com tanto amor e dedicação;

Ao Gustavo, meu companheiro de laboratório nesta caminhada, por toda a paciência em me ensinar cada uma das técnicas e tirar todas as minhas dúvidas imunológicas. À Raquel, ao Tácito e à Amanda, por terem me ensinado muito além dos segredos da ELISA. Vocês dividiram comigo cada momento dos últimos dois anos, de perto ou lá do Canadá, e fizeram de mim uma pesquisadora mais confiante e uma pessoa mais divertida.

Aos colegas do curso de Mestrado em Patologia Experimental pelo companheirismo e pelas longas horas de estudo em equipe, na biblioteca ou pela internet. Especialmente à Thacy e ao Felipe pela amizade e por responderem a tantas das minhas dúvidas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia experimental pelos ensinamentos e auxílio nos experimentos;

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para a conclusão desta etapa.

**Muito Obrigada!**

SEGATO, Carina Zerbetto. **Interleucina-17 é produzida devido a apoptose induzida por Aspartato Protease 9 de *Candida albicans***. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

## RESUMO

*Candida albicans* é um fungo da microbiota humana capaz de causar candidíase mucocutânea ou disseminada em indivíduos imunossuprimidos. O sistema imune do hospedeiro responde ao fungo através da fagocitose e produção de citocinas como a Interleucina-17 (IL-17) que tem sido amplamente relacionada com a proteção durante as infecções fúngicas. Por isso, este estudo avaliou se a capacidade de *C. albicans* para induzir a apoptose de macrófagos peritoneais está relacionada com a produção de IL-17 e qual a participação Aspartato Protease 9 neste processo. Assim, após 30 minutos da inoculação intraperitoneal de *C. albicans* em camundongos, a indução de apoptose ocorreu em cerca de 60% dos macrófagos, avaliada pela coloração com anexina-V-FITC. A adição de pepstatina-A inibiu a apoptose, sugerindo um papel das Saps neste processo. A cepa de tipo selvagem CAI-4 também induziu 55% de apoptose, enquanto uma cepa sem a Sap 9 (*sap9Δ /Δ*) não. O perfil de citocinas das cepas selvagens (CR15 e CAI-4) mostra a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-17, sugerindo a ativação da resposta Th17 durante o curso da infecção. Além disso, o fator de transcrição ROR $\gamma$ t, que regula a produção de IL-17, mostrou aumento nos níveis de mRNA. A participação da Sap9 na apoptose também pode estar ligada a ativação da resposta Th17, uma vez que a pepstatina-A e a cepa *sap9Δ /Δ* apresentaram uma diminuição da produção de IL-17. Além disso, nas fases tardias da infecção, foi observado aumento dos níveis de IL-10 e IL-22, possivelmente levando ao reparo tecidual. Por fim, nossos dados sugerem que Sap9 está envolvida na indução de apoptose de macrófagos, gerando uma resposta Th17.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*. Resposta imune. IL-17. Apoptose. SAP9.

SEGATO, Carina Zerbetto. **Interleukin-17 is produced due to *Candida albicans* induced apoptosis by Aspartic-Protease 9**. 2014. 73 p. Dissertation (Master's Experimental Patotology) – Londrina State University, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is a fungus of the human microbiota that can cause mucocutaneous or disseminated candidiasis in immunosuppressed individuals. The immune system of the host responds to the fungus through phagocytosis and the production of cytokines such as Interleukin -17 (IL -17) which has been widely related to protection during fungal infections. Therefore, this study evaluated whether the ability of *C. albicans* to induce apoptosis of peritoneal macrophages is related to IL -17 production and what is the participation of aspartic protease 9 in this process. Thus, after 30 minutes of *C. albicans* intraperitoneal inoculation in mice, induction of apoptosis occurred in approximately 60% of macrophages, assessed by staining with Annexin-V-FITC. The addition of pepstatin - A inhibited apoptosis, suggesting a role for Saps in this process. Likewise, the wild-type strain CAI-4 induced 55% apoptosis, whilst a strain lacking the aspartic protease 9 (*sap9Δ/Δ*) did not. The cytokines profile of wild-type strains (CR15 and CAI-4) shows the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  and IL-17, suggesting an activation of Th17 response during the course of infection. Moreover, the transcription factor ROR $\gamma$ t, which regulates IL-17 production, showed increased mRNA levels. The participation of Sap9 in apoptosis could also be linked to the triggering of Th17 activation, once pepstatin-A and *sap9Δ/Δ* strain presented a decreased IL-17 production. Additionally, in late infection phases, increased IL-10 and IL-22 levels were observed, possibly leading to tissue healing. Lastly, our data suggested that Sap9 is involved in macrophages apoptosis induction, triggering a Th17 response.

**Keywords:** *Candida albicans*. Immune response. IL-17. Apoptosis. SAP9.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Induction of apoptosis in macrophages by <i>C. albicans</i> CR15.....	47
<b>Figura 2</b> – IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$ production by peritoneal exudate cells during <i>C. albicans</i> CR15 infection .....	47
<b>Figura 3</b> – Expression of mRNA for IL-17, ROR $\gamma$ t and amount of IL-17 produced in peritoneal exudates and liver .....	48
<b>Figura 4</b> – Effect of pepstatin-A and aspartic protease-9 on the induction of apoptosis in macrophages by <i>C. albicans</i> .....	49
<b>Figura 5</b> – Effect of pepstatin-A and aspartic protease 9 on IL-17 production in peritoneal exudates (A and B) and liver (C and D) .....	50
<b>Figura 6</b> – Inflammatory influx into the peritoneal cavity and production of IL- 10 and IL-22 during <i>C. albicans</i> infection.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Atividade de alanina transaminase
APC	Célula apresentadora de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
CLR	Receptores de lectinas tipo-C
Con-A	Concanavalina-A
DC	Célula dendrítica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fosfatidilserina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IDO1	Indolamina 2,3-dioxigenase 1
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MINCLE	Macrophage-inducible C-type lectin
MPO	Mieloperoxidase
MR	Receptor de Manose
NET	Redes extracelulares de neutrófilos
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NK	Natural Killer (Matadoras Naturais)
PAF	Fator ativador plaquetário
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PGE2	Prostaglandina E2
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PMN	Polimorfonuclear
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
ROR	Retinoic Acid-Related Orphan Receptor
RVVC	Candidíase Vulvovaginal recorrente
Saps	Aspartato proteases

TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	Linfócitos T helper 1
TLRs	Toll like receptors
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Célula T Regulatória
UFC	Unidade formadora de colônia
YPD	Levedura Peptonada Dextrose

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	12
1.2	MORFOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	13
1.3	RECONHECIMENTO E RESPOSTA IMUNE A <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	14
1.3.1	Resposta Imune Pró-inflamatória.....	15
1.3.2	Tolerância e Resistência às Infecções Fúngicas .....	18
1.3.3	Resposta Imune Anti-inflamatória .....	19
1.3.4	Reconhecimento do Fungo pelo Sistema Imune .....	20
1.4	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	25
1.4.1	Participação das Aspartato Proteases na Modulação da Resposta Imune por <i>Candida albicans</i> .....	25
1.5	MORTE CELULAR POR APOPTOSE E INDUÇÃO DE RESPOSTA TH17.....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
2.1	OBJETIVO GERAL .....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3</b>	<b>ARTIGO SUBMETIDO</b> .....	34
	<b>ABSTRACT</b> .....	35
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	36
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	37
2.1	INFECTION OF MICE .....	37
2.2	FUNGAL CULTURE.....	38
2.3	EX VIVO ASSAYS.....	38
2.4	EVALUATION OF PERITONEAL PHAGOCYtic CELLS .....	38
2.5	CYTOKINES ASSAYS .....	39
2.6	RT-PCR FOR ROR $\gamma$ T AND IL-17 .....	39
2.7	STATISTICAL ANALYSIS .....	40
<b>3</b>	<b>RESULTS</b> .....	40
3.1	INDUCTION OF APOPTOSIS IS CRITICAL FOR STIMULATION OF IL-1 $\beta$ , IL-6 AND TGF- $\beta$ DURING <i>C. ALBICANS</i> INFECTION.....	40

3.2	C. ALBICANS INTRAPERITONEAL INFECTION TRIGGERS THE EXPRESSION OF ROR $\gamma$ T- AND IL-17-MRNA, INDUCING IL-17 PROTEIN SECRETION .....	40
3.3	DEVELOPMENT OF TH17 CELLS DEPENDS ON C. ALBICANS ASPARTIC PROTEASE ACTIVITY .....	41
3.4	IL-10 AND IL-22 ARE INVOLVED IN LATER PHASE OF C. ALBICANS INFECTION .....	41
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>42</b>
	<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERENCES</b> .....	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>67</b>
	<b>ANEXO A – Normas para submissão de artigos no periódico Microbes and Infection</b> .....	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

*Candida albicans* é um fungo normalmente encontrado colonizando todos os segmentos do trato gastrointestinal e geniturinário de mais da metade da população humana sob a forma comensal (ARENDORF, 1979). Entretanto, em condições clínicas de imunodeficiência ou imunossupressão, é possível observar a ocorrência de infecções cutâneas, de mucosas oral e vaginal e do trato gastrointestinal, e até mesmo infecções sistêmicas com alto risco de morte por sepse (CUTLER, 1991; MURRAY et al., 2006).

Muitas espécies de fungos, entre elas a própria *C. albicans*, tem co-evoluído com seus hospedeiros mamíferos, o que sugere a existência de mecanismos complexos de vigilância imune do hospedeiro associados a estratégias fúngicas sofisticadas para antagonizar a resposta imune (ROMANI, 2011). Na forma comensal, sabe-se que estes fungos são dotados da capacidade de se esquivar da vigilância imunológica do hospedeiro, impedindo assim o desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa que poderia acarretar em sua eliminação. Desta forma, o patógeno garante sua sobrevivência e persistência na superfície mucosa dos tecidos infectados de forma assintomática (ROMANI, 2000).

É importante ressaltar que o sistema imune do hospedeiro não ignora a presença do patógeno comensal, por outro lado, desenvolve um delicado equilíbrio entre as respostas pró- e anti-inflamatórias, mantendo uma relação estável entre patógeno e hospedeiro (ROMANI, 2011). Entretanto, o crescente número de casos de imunossupressão devido a cirurgias, transplantes, tratamentos quimioterápicos e infecção por HIV, por exemplo, tem levado à quebra deste equilíbrio e conseqüentemente ao aumento da incidência de candidíases (COLOMBO et al., 2006).

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas tem ganhado maior importância devido ao aumento de sua ocorrência e gravidade. A candidemia, por exemplo, tem ocupado cerca de 50% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas, estando entre os principais fatores de morte em Unidades de Terapia Intensiva e, apesar da baixa porcentagem de ocorrência (1,8%) em relação às bactérias, está associada à alta taxa de mortalidade (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

A infecção por este patógeno pode ocorrer de duas formas distintas: por via endógena, tendo como fonte a mucosa do próprio trato gastrointestinal; ou por via exógena, através de contaminação por sondas, catéteres, próteses ou administração parental de soluções contaminadas, além do contato direto com indivíduos colonizados (LACAZ, 2002).

Indivíduos HIV positivos que desenvolvem AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana) são extremamente susceptíveis a fungos patógenos oportunistas. Nestes casos, a infecção por *C. albicans* geralmente é recorrente, podendo ser apontada inclusive como indicativo da doença viral. A infecção se apresenta principalmente na forma de candidíase orofaríngea, havendo também o risco de ocorrência de candidíase sistêmica (GREENSPAN et al., 1990; KLATT; BRENCHLEY, 2010). O desenvolvimento de infecções oportunistas nestes casos se dá devido à perda de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, implicando numa produção ineficiente de citocinas em resposta ao fungo patogênico (GLOCKER; GRIMBACHER, 2010).

Em adição ao HIV, existe ainda uma gama de doenças genéticas raras que causam susceptibilidade à candidíase mucosa recorrente, sendo que estas afetam o reconhecimento do fungo pelo sistema imune, ou o desenvolvimento de uma resposta imune adequada contra o patógeno (GAFFEN et al., 2011).

Outros fatores de risco para as candidíases são as disfunções metabólicas, os extremos de idade e especialmente as alterações na função e número de células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, o que leva a uma redução na eficácia da imunidade celular (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

## 1.2 MORFOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIIS DE *CANDIDA ALBICANS*

Um dos aspectos mais marcantes da biologia do fungo *C. albicans* é o dimorfismo celular, ou seja, a capacidade de apresentar variações morfológicas podendo ser encontrada como levedura unicelular (blastocóndio), forma que permite melhor disseminação hematogênica; clamidósporo (também unicelular), forma resistente em condições adversas (MOLERO et al., 1998); ou como filamento, podendo ser em forma de hifa verdadeira ou de pseudohifa, que em geral são as formas infectantes que permitem a invasão e o dano tecidual do hospedeiro (SUDBERRY et al., 2004).

A variação da forma de levedura para as formas filamentosas é dependente da alteração de condições ambientais tais como pH, temperatura, disponibilidade de soro, privação nutricional e altas concentrações de fosfato (CORNER; MAGEE, 1997; CUTLER, 1998; KOBAYASHI; SADBERRY et al., 2004).

A morfogênese celular em *C. albicans* está associada a mudanças na composição proteica e na arquitetura da parede celular. Esta é formada por múltiplas camadas de arranjos complexos de carboidratos e proteínas, sendo que ambos não estão presentes em seres humanos, o que influencia no reconhecimento do patógeno pelo sistema imune (GOW et al., 2011). A composição da parede celular, bem como as alterações ocorridas durante a morfogênese são de extrema importância para o equilíbrio da relação de comensalismo ou infectividade entre patógeno e hospedeiro (GOW et al., 2012).

De maneira geral, a parede celular de *C. albicans* é composta por quitina, glucana, manana, manoproteínas e glicolipídeos que são completamente diferentes dos componentes da parede celular bacteriana ou do envelope viral (KATAOKA et al., 2002; TADA et al., 2002). A camada externa da parede celular de *C. albicans* é composta quase em sua totalidade por manana e manoproteínas, que representam 30 a 40% de seu peso seco (KLIS et al., 2001). A camada interna por sua vez tem predominância de quitina,  $\beta$ -(1,3)- e  $\beta$ -(1,6)-glucana (GOW et al., 2011).

A expressão destas proteínas de parede fúngica é alterada de forma significativa quando o microrganismo faz a transição de levedura para hifa, durante o processo patológico de invasão e destruição tecidual, de forma que as células do sistema imune são capazes de distinguir entre a forma comensal e a infectante, iniciando a produção de citocinas específicas em resposta (GOW et al., 2011; HORNBAACH et al., 2009; NETEA et al., 2008a; ROMANI, 2011).

### 1.3 RECONHECIMENTO E RESPOSTA IMUNE A *CANDIDA ALBICANS*

Em locais de interação constante entre patógeno e hospedeiro, como a pele e mucosa dos tratos respiratório, gastrointestinal e genitourinário, os mecanismos da imunidade inata estão presentes de forma constitutiva. Células *Natural Killers*, Defensinas, Colectinas (proteínas de ligação à manose) e o Sistema Complemento constituem os principais mecanismos de defesa local, proporcionando

opsonização e eliminação do fungo, além da presença das células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) que possibilitam reconhecimento e início de uma resposta adaptativa, neste caso predominantemente Th1 ou Th17 (ABBAS, et al., 2011; ISMAIL *et al.*, 2002; ROMANI, 2011).

Esta sinalização através dos fagócitos leva à produção de citocinas que podem favorecer a inflamação, e por isso são chamadas de pró-inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-18, predominantes na resposta inata, e IL-17 e IFN- $\gamma$  envolvidos tanto na resposta inata quanto na adaptativa. Por outro lado, as citocinas que reduzem a resposta inflamatória são comumente chamadas de anti-inflamatórias, cujas principais representantes são IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4. Algumas citocinas são de extrema importância na diferenciação de linfócitos T virgens em células específicas Th1, Th2 ou T citotóxicas, como é o caso da IL-12, IL-4 e IFN- $\gamma$ , respectivamente (PEREIRA, 2011).

### 1.3.1 Resposta Imune Pró-inflamatória

A Interleucina-12 (IL-12), conhecida por seu papel pró-inflamatório, sinaliza via STAT-4 levando à ativação do fator de transcrição T-bet que é essencial para a indução de respostas do padrão Th1 (AMSEN et al., 2009). Além disso, a IL-12 possui função de estimular a produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez ativa os macrófagos potencializando sua atividade microbicida, aumenta a expressão de MHC-I e II e a apresentação de antígenos (ROMANI et al., 1997).

Esta citocina está envolvida na resposta imune anti-*Candida* como foi observado por Han et al. (2013), onde a expressão do mRNA de IL-12 se mostrou aumentada em macrófagos tratados com leveduras de *C. albicans*, mas não sofreu alteração em contato com as formas filamentosas, indicando neste caso uma especificidade da resposta para a forma unicelular do fungo.

Além da IL-12, a imunidade mediada pela Interleucina-17 desempenha um papel chave na proteção contra infecções fúngicas, tanto em camundongos quanto em humanos, e algumas células da imunidade inata têm sido apontadas como possíveis produtoras de IL-17. Diversos estudos (revisados em CUA; TATO, 2010) tem demonstrado que as células T  $\gamma\delta$  são importantes células da imunidade inata produtoras de IL-17 durante a inflamação autoimune e doenças infecciosas. Outras células da imunidade inata produtoras de IL-17 já descritas na

literatura incluem as células NK, as CD3+ *Invariant Natural Killer T* (iNKT), as células indutoras de tecido linfóide (LTi) e as células de Paneth, sendo que todas estas células desempenham um papel importante na vigilância tecidual, especialmente nas mucosas, na pele, no fígado, nos pulmões e órgãos linfóides secundários.

Dentre as funções fisiológicas da IL-17 produzida pelas células da imunidade inata é possível destacar a indução de fatores granulopoiéticos como G-CSF e CCL20 pelas células epiteliais, os quais são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos essenciais para um controle rápido e efetivo de fungos e bactérias (CUA; TATO, 2010).

De maneira bastante específica, as células produtoras de IL-17 de camundongos e de humanos expressam fator de transcrição nuclear ROR $\gamma$ t, que interage diretamente com a região promotora do gene *il17*, sendo responsável pela produção desta citocina. Assim sendo, a expressão de ROR $\gamma$ t serve também de marcação positiva para a presença destas células, e em menor quantidade ROR $\alpha$  (CHATTERJEE et al., 2012; IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008).

Adicionalmente às células da imunidade inata, a linhagem de linfócitos Th17 atua produzindo IL-17 na imunidade adaptativa. Juntamente com outros mecanismos antimicrobianos, essas células conferem resposta à candidíase por meio do recrutamento e mobilização de neutrófilos para o sítio de infecção e da expressão de defensinas e outros fatores antifúngicos (CONTI et al., 2009).

As células da linhagem Th17 são importantes na defesa do hospedeiro contra *C. albicans* pois expressam além de IL-17 (também chamada de IL-17A), IL-17F e IL-22. A IL-17 e a IL-17F são citocinas proximamente correlacionadas que sinalizam através de um receptor comum, composto de duas subunidades (IL-17RA e IL-17RC), cuja sinalização é crucial para uma imunidade efetiva anti-*Candida* (CONTI; GAFFEN, 2010; VELDHONEN et al., 2006). A STAT3, principal proteína da família STAT ativada pela IL-6, é considerada essencial para a diferenciação das células do subtipo Th17, tanto em camundongos quanto em humanos (YANG et al., 2007). A IL-21 também tem sido implicada nesta diferenciação quando induzida por IL-6 na presença de TGF- $\beta$ , e a IL-23 é responsável por suportar a expansão e manutenção deste subtipo celular (KORN et al., 2007; VELDHONEN et al., 2006).

No caso de candidemia sistêmica, Huang et al. (2004) demonstrou que camundongos deficientes em IL-17R apresentaram uma redução na contagem

de neutrófilos no sangue periférico, o que foi correlacionado com falhas no recrutamento de neutrófilos e na atividade da mieloperoxidase (MPO) no fígado. Em humanos, vários estudos (revisados em CYPOWYJ et al., 2012) tem demonstrados que alterações genéticas que resultem em falhas na produção de IL-17 ou na expressão de seus receptores podem estar diretamente relacionadas ao desenvolvimento de Candidase Mucocutânea (CMC). Uma série de anomalias genéticas tem sido apontadas como responsáveis por pré-dispor pacientes ao quadro de CMC, dentre elas deficiência autossômica recessiva no TCR- $\alpha$ , algumas formas de desordens ligadas ao cromossomo X, deficiências autossômicas recessivas em CD25, IRF8 e outros defeitos em células T, que tornam estas pessoas susceptíveis não apenas a infecções por *C. albicans*, mas também a inúmeros outros agentes patogênicos.

Neste contexto, a IL-17 tem surgido como uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias devido a esta sua capacidade de modular as respostas mediadas por neutrófilos, e também em função de seu papel na proteção das mucosas por induzir um aumento nas defensinas produzidas por células do epitélio intestinal (HUANG et al., 2004; REHAUME et al., 2010).

Envolvida na diferenciação destes linfócitos Th17, outra citocina pró-inflamatória produzida em resposta a *C. albicans* é a IL-1 $\beta$ , liberada por fagócitos mononucleares ativados, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais, e que é conhecida por desempenhar um papel central na indução, progressão e manutenção da resposta inflamatória durante as infecções (ABBAS et al., 2011; DINARELLO, 1994, 2005). A síntese e a liberação da IL-1 $\beta$  são reguladas por um processo de duas etapas: primeiro, uma via dependente da ativação do fator nuclear NF- $\kappa$ B dispara a transcrição de pró-IL-1 $\beta$ , precursor inativo de 31-33kDa; em seguida a pró-IL-1 $\beta$  é clivada proteoliticamente pela enzima Caspase-1 e torna-se a forma ativa da citocina IL-1 $\beta$  (17-18kDa) pronta para ser secretada (FRANCHI et al., 2012; KAMINISHI et al., 1990). Outras enzimas, dentre elas algumas serina proteases como a elastase neutrofílica, a catepsina-G e a granzima A também são capazes de clivar o precursor inativo da citocina IL-1 $\beta$  no fragmento ativo (revisado em BEAUSÉJOUR et al., 1998).

Seu papel na proteção de hospedeiros mamíferos contra *C. albicans* tem sido demonstrado em camundongos deficientes nesta citocina, que apresentam redução da taxa de sobrevivência e aumento da sobrecarga fúngica em relação a

animais normais (HISE et al., 2009; VONK et al., 2006). Além disso, tem sido demonstrada a participação desta citocina como reguladora do processo de diferenciação de células do tipo Th17 (CHUNG et al., 2009).

Juntamente com a IL-1 $\beta$ , a interleucina-6 também participa da diferenciação de linfócitos T helper produtores de IL-17. Esta citocina participa das respostas inflamatórias agudas e apresenta efeitos locais e sistêmicos que incluem, além da diferenciação das células T, a indução da síntese hepática de outros mediadores inflamatórios e a estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea. Sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e células dendríticas entre outras, a IL-6 é produzida em resposta à infecção por *C. albicans* e também participa na defesa do hospedeiro contra esse patógeno (ABBAS et al., 2011; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007; ZHANG et al., 2013).

### 1.3.2 Tolerância e Resistência às Infecções Fúngicas

Contribuindo na regulação do balanço entre células Th17 e T reguladoras (Tregs), a enzima Indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) é um dos principais reguladores da tolerância antifúngica em superfícies mucosas. Devido a sua habilidade de degradação do triptofano e consequente geração de quinureninas, metabólitos desta via com capacidade imunomodulatória, esta enzima é capaz de induzir células Treg a suprimir a atividade antifúngica de células T, favorecendo assim a persistência do fungo (ZELANTE et al., 2009). Ela não apenas contribui para a homeostase imune local, mas também limita a atividade pró-sobrevivência e a promoção da virulência da célula fúngica modulando a ação da IL-17A (ZELANTE et al., 2012).

Foi recentemente descoberto por De Luca et al. (2013) que variações genéticas que aumentam a expressão de IDO1 podem contribuir para a proteção da Candidíase Vulvovaginal Recorrente (RVVC) devido ao aumento da produção de tais quinureninas. De forma semelhante, o mesmo estudo demonstrou que variações que induzem aumento de IL-22 também são protetoras.

A IL-22 é mais uma das citocinas conhecidas por contribuir com a resistência antifúngica nas superfícies mucosas. Produzida por células Th22, Th1, Th17, NK22, NKT e T $\gamma\delta^+$  (CELLA et al., 2009; WITTE et al., 2010), ela assegura a

integridade do epitélio via fosforilação de STAT3, conhecida por ser requerida para limitar o dano e a inflamação na candidíase mucosa (BONIFAZI et al., 2009; DE LUCA et al., 2010; EYERICH et al., 2011; GESSNER et al., 2012). É sabido que a IL-22 é capaz de prover resistência antifúngica em condições de deficiência de Th1 e Th17 através de mecanismos que envolvem o controle do crescimento das leveduras infectantes por induzir peptídeos antimicrobianos com atividade candidacida (DE LUCA et al., 2010).

A expressão do receptor de IL-22 é restrita aos tecidos, não estando presente em células do sistema imune, o que garante que o sistema imune exerça controle sobre a homeostase de tecidos como a pele e mucosas através da ação desta citocina (WITTE et al., 2010; ZELANTE et al., 2011).

### 1.3.3 Resposta Imune Anti-inflamatória

A indução de uma resposta pró-inflamatória adequada é necessária para o controle das infecções fúngicas, porém, se não for contida, uma resposta exacerbada pode ocasionar sérios danos aos tecidos do hospedeiro. Desta forma, citocinas anti-inflamatórias são necessárias para controlar a resposta e direcionar para a resolução do processo inflamatório e consequente reparo tecidual. Dentre estas citocinas imunorregulatórias, a IL-10 é considerada a mais importante por seu efeito anti-inflamatório e imunossupressivo (MOORE et al., 2001), sendo benéfica no controle da resposta inflamatória e do crescimento fúngico.

A fagocitose da hifa ou a opsonização da levedura de *C. albicans* resultam na produção de IL-4 e/ou IL-10, aumentando assim a regulação de moléculas co-estimulatórias e MHC-II, assim como a ativação de células TH2/Treg (ROMANI et al., 2002).

Quando produzida em altos níveis pelas células Th2 e Treg, a IL-10 afeta negativamente a produção de IFN- $\gamma$ , limitando assim a resposta inflamatória, porém sem inibir o efeito protetor da resposta Th1 controlada. Este quadro muitas vezes impede a eliminação total do patógeno e pode levar à tolerância ou a quadros de candidíase crônica (LILIC et al., 2003; ROILIDES et al., 1998; ROMANI; PUCETTI, 2006). Desta forma, *Candida albicans* se torna capaz de induzir a imunossupressão do hospedeiro através da sinalização via TLR2, aumentando a

produção de IL-10 e a ativação de células Treg (DENNING et al., 2007; NETEA et al., 2004b; SUTMULLER et al., 2006).

Como as hifas de *Candida* são dotadas de atividade tolerogênica, a produção relativa de IL-10 nos locais de infecção e/ou colonização pode refletir a um estado de tolerância protetora (alta proporção IFN- $\gamma$ :IL-10) ou a indução de uma atividade descontrolada de células T-reg (baixa proporção IFN- $\gamma$ :IL-10) levando à imunoevasão (ROMANI, PUCCETTI, 2006).

Han et al. (2013) observaram que quando macrófagos foram tratados com leveduras de *C. albicans*, o nível de expressão do mRNA de IL-10 não sofreu alteração, comparado ao grupo controle. Porém, o contato dos macrófagos com a forma invasiva de hifa levou a uma rápida elevação na expressão deste mRNA, respondendo à necessidade de controlar a resposta inflamatória contra este fungo.

O fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) também é uma citocina com função anti-inflamatória produzida por células T (predominantemente Tregs), macrófagos e outros tipos celulares como fibroblastos por exemplo. Além de participar da diferenciação de células Th17 e Tregs como já dito anteriormente, a principal ação inibitória desta citocina se dá sobre a proliferação e o desenvolvimento das funções efetoras de linfócitos T e sobre a ativação de macrófagos (ABBAS et al., 2011; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006).

Spaccapelo e colaboradores (1995) evidenciaram um aumento na produção endógena de TGF- $\beta$  rapidamente logo após a infecção de camundongos com uma vacina de *C. albicans* viva, e demonstraram *in vitro* que esta citocina tinha ação inibidora sobre a atividade candidacida de macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ . Tais observações sugeriram já na época que esta citocina estaria diretamente envolvida na regulação da resposta imune anti-candida.

#### 1.3.4 Reconhecimento do Fungo pelas Células do Sistema Imune

Conforme descrito acima, inúmeros trabalhos tem demonstrado que os componentes do sistema imune inato e adaptativo são capazes de responder à invasão fúngica através da produção de citocinas, conferindo assim a resistência do hospedeiro ao patógeno. Porém para que isso ocorra, é necessário que haja

reconhecimento do microrganismo pelas células fagocíticas (GAUGLITZ et al., 2012). Este reconhecimento do patógeno pelo sistema imune do hospedeiro ocorre basicamente pela percepção das estruturas bem conservadas nos microrganismos, que não estão presentes nas células dos mamíferos, conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Uma grande diversidade de receptores é responsável por este reconhecimento, sendo por isso conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs), dentre os quais figuram os Toll-like receptors (TLRs), Receptores de lectinas tipo-C (CLRs), Receptores de Manose (MR) entre outros (NETEA et al., 2004a).

Para o reconhecimento dos PAMPs de *C. albicans*, muitos estudos tem citado a importância dos receptores TLR2 e TLR4 (BELLOCCHIO et al., 2004; NETEA et al., 2002, 2004b; VILLAMON et al., 2004). O Receptor de Manose também tem sido implicado na produção de citocinas em resposta à *C. albicans* (YAMAMOTO et al., 1997). Embora TLR1, TLR9 e TLR6 também estejam envolvidos no reconhecimento dos PAMPs de *C. albicans*, nenhum deles está envolvido na resposta imune contra este organismo (NETEA et al., 2008b; VAN DE VEERDONK et al., 2008).

Alguns estudos tem sugerido que as proteínas manosiladas da parede de *C. albicans* podem induzir a produção de citocinas por interação com os receptores de superfície celular como o TLR4 (TADA et al., 2002; VECCHIARELLI et al., 1991), porém a expressão deste receptor em macrófagos é aumentada apenas em contato com as formas unicelulares de *C. albicans*, indicando que ele não está envolvido diretamente na resposta às formas filamentosas (HAN et al., 2013)

Também tem sido reportado o reconhecimento de fosfolipomananas por TLR2 e consequente indução de citocinas pró-inflamatórias (JOUAULT et al., 2003), ou anti-inflamatórias como IL-10, atuando na supressão da resposta inflamatória contra os fungos do gênero *Candida* e aumento da sobrevivência de Tregs (NETEA et al., 2004b). O reconhecimento de  $\beta$ -glucanas pelo complexo TLR2 e Dectina-1 também já foi bastante estudado (GANTNER et al., 2003; HISE et al., 2009; TAYLOR et al., 2007; YUAN; WILHELMUS, 2010).

Netea e colaboradores (2006) demonstraram que os três componentes da parede celular do fungo patogênico podem ser reconhecidos por monócitos e macrófagos, e subsequentemente induzir a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias por vias diferentes: as *N-linked* mananas são reconhecidas por

Receptores de Manose, as *O-linked* mananas por TLR4 e as  $\beta$ -glucanas pelo complexo Dectina-1/TLR2.

Adicionalmente à produção de citocinas, as  $\beta$ -glucanas podem induzir também a quimiotaxia de neutrófilos humanos e a formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) que podem capturar e matar tanto a levedura quanto as hifas de *C. albicans* (URBAN et al., 2006). Ainda observaram que as fosfolipomananas aparentemente não estão envolvidas na indução da produção de citocinas.

Em estudos prévios, nosso grupo verificou um aumento na atividade dos Receptores de Manose (MR) em macrófagos de camundongos pré-tratados com Concanavalina-A (Con-A). A lectina mitogênica concanavalina-A (Con-A), isolada de *Canavalia ensiformis* induz a ativação policlonal de linfócitos (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1967). Con-A liga-se diretamente às moléculas de carboidratos (D-glucopiranosídeo e D-manopiranosídeo) do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e no receptor do linfócito T (TCR) e induz a resposta celular pela oligomerização de TCRs na superfície celular, resultando na indução da resposta celular, e a produção de citocinas como IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. (ANDERSSON; MELCHERS, 1976).

Foi observado por nosso grupo que a administração deste mitógeno durante 3 dias estimulou um aumento significativo da atividade do MR em comparação com o grupo não tratado (GERALDINO et al., 2010). Neste mesmo estudo foi observado que os macrófagos de camundongos pré-tratados com Con-A foram capazes de destruir 70% do inóculo de *C. albicans* cepa CR15 durante 1 hora de co-incubação, o que não ocorreu no grupo controle não tratado, que matou apenas 30% do patógeno.

Foi verificado anteriormente que o tratamento com Con-A 4 dias antes da infecção por *C. albicans* proporcionou uma predominância de macrófagos ativados no exsudato peritoneal (LOYOLA et al., 2002; MORESCO et al., 2002) com alta expressão de receptores de manose inclusive em macrófagos de camundongos recém desmamados e portanto com sistema imunológico imaturo. O fato mais importante é que os camundongos de 21 dias de idade foram protegidos de uma dose letal de *C. albicans* quando pré-tratados com Con-A. Além disso, a proteção proporcionada pela Con-A foi evidenciada também através da alta taxa de sobrevivência de animais infectados com dose letal de *C. albicans*, da ausência de

dano hepático (valores normais de ALT), da ativação de macrófagos, da produção em níveis fisiológicos de TNF- $\alpha$  e do aumento na eficácia de eliminação do patógeno (CONCHON-COSTA et al., 2007).

Além da Concanavalina-A, também foi evidenciado que Artin M, extraída de semente de *Artocarpus integrifolia*, foi capaz de induzir a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  durante a infecção com *C. albicans* CR15, e também responsável por aumentar a fagocitose de *C. albicans* via Receptor de Manose e Dectina-1. Após 2 h de infecção foi verificado aumento significativo da produção de TNF- $\alpha$ , que contribuiu com a rápida eliminação do patógeno na fase inicial da infecção (LOYOLA et al., 2012). Artin M apresentou efeito protetivo contra infecção por *C. albicans* por ser ainda capaz de induzir resposta imune Th1 e Th17 em camundongos (CUSTODIO, et al., 2011).

Embora os TLR e MR estejam envolvidos no desenvolvimento de resposta imune anti-*Candida*, os CLRs aparentemente são os PRRs dominantes implicados no reconhecimento do fungo patogênico. Esses receptores são expressos nas células apresentadoras de antígenos e reconhecem componentes da parede celular de *C. albicans* como as mananas e  $\beta$ -glucanas. As *N-linked*-mananas, localizadas na porção externa da parede celular, são reconhecidas pelo receptor DC-SIGN (CAMBI et al., 2008; TAKAHARA et al., 2012) e pelo Dectina-2 (BI et al., 2010; ROBINSON et al., 2009). As  $\beta$ -glucanas, localizadas na porção mais interna da parede e expostas durante o brotamento das leveduras, são reconhecidas pelo Dectina-1 e pelo Mincle (GANTNER et al., 2005; NETEA et al., 2008a; TAYLOR, et al., 2007). Todos estes receptores parecem mediar a sinalização através da quinase Syk1, das moléculas adaptadoras CARD9/Bcl-10/MALT1, culminando na ativação de NF- $\kappa$ B e Ras/Raf-1 (WILLMENT; BROWN, 2008; GOW et al., 2011). Assim, o contato desses receptores com seus respectivos ligantes resulta na produção de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 e IL-17, os quais são importantes para o desenvolvimento e homeostase de células Th17, ou são produtos de sua resposta (revisado em GAFFEN et al., 2011).

Nosso grupo observou em estudos anteriores uma alta atividade dos Receptores de Manose e Dectina-1 em células ativadas por Con-A. Devido a este aumento na atividade dos receptores ter sido correlacionado a um aumento na produção de IL-17, foi proposto que estas vias de fagocitose podem estar mediando

a resposta imune adaptativa, envolvendo a diferenciação de células Th17 durante o curso da infecção de camundongos por *Candida* (DE CARVALHO et al., 2012).

A ativação dos receptores Dectina-1 e Dectina-2 em resposta ao reconhecimento do fungo patogênico pode levar ao direcionamento de uma resposta do tipo Th17 com envolvimento do complexo inflamassomo, por meio de uma via que utiliza a molécula adaptadora CARD-9 (CYPOWYJ et al., 2012). A participação do inflamassomo na resposta contra infecções por fungos do gênero *Candida* tem sido demonstrada de várias maneiras. Embora já se tenha visto que os receptores NOD1 e NOD2 não são necessários para o reconhecimento deste fungo patogênico, outros receptores como IL-1R, Dectina-1 e 2 e a proteína adaptadora ASC, tem sido evidenciados participando da ativação do complexo inflamassomo em modelos de candidíase mucosa oral (HISE et al., 2009; VAN DER GRAAF et al., 2006).

Foi demonstrado recentemente que estes receptores atuam como um sensor extracelular para PAMPs de micobactérias e fungos, incluindo *C. albicans*, que podem levar a ativação do inflamassomo e controlar o processamento da Pró-IL-1 $\beta$ , porém através de um complexo não-canônico constituído por MALT1–caspase-8–ASC (GRINGHUIS et al., 2012). Assim, Dectina-1 está envolvido com o direcionamento de uma resposta Th17 protetora através desta via, além de que a internalização do patógeno dispara adicionalmente a ativação do inflamassomo canônico NLRP3. Ao contrário da ativação de NLRP3, esta via não-canônica do inflamassomo independe da internalização do patógeno, e uma vez que algumas cepas de *C. albicans* são capazes de ativar esta via, enquanto outras cepas recrutam a via canônica, é possível inferir que os ligantes para NLRP3 não estão presentes em todos os fungos (HERNÁNDEZ-SANTOS; GAFFEN, 2012).

Em contraste à resposta mediada pela ativação do inflamassomo NLRP3, o qual limita a severidade da infecção tanto em compartimentos estromais quanto hematopoiéticos, NLRC4 é responsável por limitar a candidíase mucosa quando ativado no estroma da mucosa, revelando assim papéis específicos, dependentes do tecido, para os dois tipos de inflamassomo na resposta imune inata contra infecção mucosa por *Candida* (TOMALKA et al., 2011).

O desenvolvimento de uma resposta protetora do tipo Th17 com envolvimento do inflamassomo é resultado do reconhecimento das hifas de *Candida* pelos macrófagos humanos. Cheng et al. (2011) demonstraram que a forma de levedura não é capaz de induzir a ativação do inflamassomo, sugerindo que esta via

tem um papel importante na discriminação entre leveduras colonizantes e hifas invasivas.

#### 1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS*

O desenvolvimento da infecção por *C. albicans* é resultante da capacidade que o fungo detém de aderir ao tecido, se multiplicar e invadi-lo. Esta aptidão é determinada por inúmeros fatores de virulência que incluem entre eles a capacidade de mudanças fenotípicas com formação de tubo germinativo, a expressão de moléculas de adesão que permitem a aderência do fungo às células do hospedeiro, a produção e secreção de proteases e outras enzimas hidrolíticas (JACOBSEN et al., 2012; NAGLIK et al., 2003; ODDS, 1994; PHAN et al., 2007; ROMANI et al., 2003; ZAKIKHANY et al., 2008).

Dentre todos esses fatores de virulência, a ação das enzimas hidrolíticas já é bem descrita em bactérias, protozoários e leveduras, mas no caso de *C. albicans*, a importância das aspartato proteases secretadas (Saps) ainda tem sido estudada e demonstrada experimentalmente (DALLE et al., 2010; GROPP et al., 2009; RAMAGE et al., 2012) e elas já são consideradas como um dos principais fatores de virulência deste fungo (CALDERONE; FONZI, 2001; NAGLIK et al., 2003, 2004; SCHALLER, et al., 2005). Estas enzimas estão envolvidas na aderência e invasão de superfícies mucosas e subsequente disseminação do fungo no organismo (DALLE et al., 2010; FELK et al., 2002; KRETSCHMAR et al., 1999; RUCHEL et al., 1990).

Assim, a inibição das Saps pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de drogas que reduzam a virulência do patógeno, especialmente pensando nos riscos acentuados de mortalidade por infecção generalizada e no aumento a resistência às drogas de tratamento (BRAGA-SILVA; SANTOS, 2011; STEWART; ABAD-ZAPATERO, 2001).

##### 1.4.1 Participação das Aspartato Proteases na modulação da resposta imune por *Candida albicans*

A família de Saps de *C. albicans* inclui 10 isoenzimas com pesos moleculares entre 35 a 50 kDa, sendo elas codificadas como pré-pró-enzimas

imaturas por uma família de 10 diferentes genes (NAGLIK et al., 2003, 2004). Estas isoenzimas diferem entre si no pH ótimo para sua atividade, variando entre 2 e 7 dentro da família.

Os genes da família *SAP* apresentam regulação diferencial dependente do ambiente em que o microrganismo está inserido (SCHALLER et al., 2001), e entre os 10 genes, a expressão de *SAP1–3* tem sido observada predominantemente em leveduras. Assim essas enzimas são requeridas durante as infecções mucosas e apresentam participação no processo de alteração fenotípica (FELK et al., 2002; WHITE et al., 1993, 1995;). Em comparação a eles, os genes *SAP4–6* são expressos nas formas filamentosas e assim estão relacionados à interação com os tecidos do hospedeiro durante as infecções sistêmicas e ao escape do sistema imune (BORG-VON ZEPELIN et al., 1998; FELK et al., 2002).

Por outro lado, a expressão de *SAP7* tem sido detectada em modelos animais, mas não *in vitro*, o que pode ser correlacionado com infecções intravenosas (TAYLOR et al., 2005). Seu papel ainda permanece bastante obscuro devido ao fato de ser uma protease insensível à Pepstatina, dificultando assim seu estudo em modelos de infecção (AOKI et al., 2012). No caso de *SAP8*, a expressão é transitoriamente observada em leveduras e modelos epiteliais (MONOD et al., 1998; NAGLIK, et al., 2008). *SAP9* e *SAP10*, que codificam domínios de ligação à GPI (glicosilfosfatidilinositol) são expressos sob diversas condições, e acredita-se que estejam envolvidos na manutenção da integridade da parede celular através do processamento das proteínas da parede (ALBRECHT et al., 2006; HORNBAACH et al., 2009; SCHILD et al., 2011). Embora tenham funções e expressões diferenciadas, todos os produtos gênicos da família *SAP* parecem contribuir para os processos de virulência *in vitro*, bem como adesão, invasão tecidual e evasão do sistema imune.

Analisando comparativamente as sequências de Sap9 e Sap10, foi verificado que elas diferem das demais isoenzimas da família Sap não apenas na similaridade das sequências, mas também pelos múltiplos locais de N-glicosilação e pelas sequências de ligação à GPI na cadeia C terminal (EISENHABER et al., 2004). Segundo Albretch e colaboradores (2006), esse é o provável motivo destas Saps não serem secretadas, mas permanecerem ligadas à superfície celular.

As duas proteínas estão localizadas na superfície celular do fungo, porém Sap9 está predominantemente localizada na membrana celular enquanto Sap10 está tanto na membrana quanto na parede (ALBRETCH et al., 2006). Devido

a esta exposição para o espaço extracelular, os pesquisadores concluíram que a atividade proteolítica destas enzimas deve ocorrer na superfície celular, e que desta forma os substratos destas proteases podem ter origem tanto do hospedeiro quanto do próprio fungo.

Albretch e colaboradores (2006) também evidenciaram o papel da Sap9 e Sap10 em manter a integridade da superfície celular, uma vez que mutantes nestas proteases exibiram brotamento anormal onde as células filhas não foram capazes de se soltar das mães, permanecendo associadas a elas formando cadeias de células ou grumos. Também observaram que a deleção de dos genes *SAP9* e *SAP10* resultou em mutantes com habilidade reduzida de aderir, invadir e danificar as células epiteliais, levando à atenuação do dano tecidual durante o modelo de infecção oral.

Recentemente foi demonstrado que Sap9 especificamente tem um grande impacto no reconhecimento de *C. albicans* pelos neutrófilos, sendo que o gene *SAP9* é requerido para a indução da quimiotaxia dos PMNs em direção ao local de infecção. A deleção desse gene leva a uma redução da liberação de intermediários reativos de oxigênio pelos PMNs, e conseqüentemente à redução de apoptose induzida por *C. albicans* e disparada pela formação de EROS, sugerindo inclusive a participação da Sap9 no início de uma resposta imune protetora contra o patógeno (HORNBAACH et al., 2009).

Vários membros da família Sap, incluindo Sap1, Sap2, Sap3, e Sap6, são capazes de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos humanos por meio da ativação da via Akt/NF- $\kappa$ B. Especialmente Sap1, Sap2 e Sap6 são potentes indutoras da produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6 de maneira independente de sua atividade proteolítica e do pH ótimo individual (PIETRELLA et al., 2010). Sap2 e Sap6 disparam a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 através da ativação do complexo inflamassomo NLRP3, com atuação de caspase-1, que é responsável pela clivagem e ativação da citocina pró-IL-1 $\beta$  na citocina bioativa IL-1 $\beta$ . Este processo de ativação está condicionado à internalização das Saps por um mecanismo dependente de clatrina, de indução intracelular do efluxo de K<sup>+</sup>, e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). A ativação do inflamassomo pelas Saps 2 e 6 difere em muitos aspectos daquela induzida por LPS-ATP (PIETRELLA et al., 2013).

Foi demonstrado por de Andrade e Felipe (1992) que a inibição da atividade das Saps preveniu a destruição de macrófagos co-incubados com *C. albicans*. A capacidade do microrganismo em induzir a morte das células fagocíticas pode ser considerado um importante fator de virulência por favorecer a invasão tecidual e a disseminação do patógeno (FREIRE DE LIMA et al., 2000; IBATA-OMBETTA et al., 2003; RODRIGUES et al., 1999). Além disso, Kaminishi e colaboradores (1995) encontraram que as Saps de *Candida albicans* tem capacidade de reduzir as atividades bactericida e de opsonização do soro humano, através da degradação da porção Fc da IgG e da proteólise da proteína do Complemento C3.

Um estudo realizado *in vitro* por Reales-Calderón e colaboradores (2013) analisou marcadores apoptóticos e identificou a prevalência de sinais anti-apoptóticos durante a interação da levedura viável de *C. albicans* com os macrófagos, sugerindo que ao lado da inflamação, a apoptose representa uma via central para a defesa do hospedeiro contra esse patógeno uma vez que seu bloqueio possibilita que os macrófagos permaneçam viáveis para eliminar o microrganismo invasor. Por outro lado, Wu e colaboradores (2013) observaram que a internalização das proteínas Saps 4-6 resultou na permeabilização parcial das membranas lisossomais, liberando seu conteúdo para o citoplasma da célula e disparando a cascata de apoptose via ativação de caspases. Desta forma, temos um papel dualista da apoptose frente à resposta imune anti-*Candida*, uma vez que sua inibição pode favorecer a manutenção das células viáveis mas sua ocorrência é capaz de estimular outras vertentes da imunidade anti-fúngica.

A Pepstatina-A, um pentapeptídeo produzido por Actinomicetos (UMEZAWA et al., 1970), é um inibidor competitivo das aspartato proteases. Seu resíduo central de Statina contém o aminoácido Aspartato responsável pela ação inibitória demonstrada sobre a proteína Sap2 (CUTFIELD et al., 1995), conferindo a esta molécula a capacidade de se ligar ao sítio ativo de clivagem da enzima, inibindo sua atividade.

Este inibidor tem sido amplamente utilizado em estudos *in vitro*, os quais têm provido evidências diretas da contribuição das Saps para a virulência de *C. albicans*. Estudos com modelos de infecção mucosa em murinos e ratos tem demonstrado a capacidade da Pepstatina em reduzir a colonização e a invasão dos tecidos hospedeiros pelo fungo patogênico (DE BERNARDIS et al., 1997, 1999).

Porém, a Pepstatina é ineficiente em infecções sistêmicas quando administrada de forma intravenosa (RUCHEL et al., 1990), provavelmente devido às suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis. Além do mais, ela exibe baixa seletividade sendo também capaz de inibir aspartato proteases de mamíferos (CADICAMO et al., 2013), sendo por isso desconsiderada como uma possível droga.

Porém, o descobrimento e a caracterização da Pepstatina-A foi de grande importância uma vez que abriu a possibilidade de estudos que busquem modificações de sua estrutura (CADICAMO et al., 2013), o que representa um ponto de início para o desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos para as aspartato proteases.

Utilizando isolados de pacientes HIV+, nosso grupo evidenciou anteriormente a rápida exposição de fosfatidilserina pela ligação à Anexina-V-FITC em macrófagos após 5 ou 15 minutos de co-incubação com *C. albicans* cepa CR1, indicando sinais iniciais de apoptose destas células. Após co-incubação por 20 minutos com Pepstatina-A, os macrófagos não exibiram marcação positiva para Anexina após 5 minutos de co-incubação com as leveduras de *C. albicans*, e raramente foram marcados após 15 minutos, demonstrando uma inibição do processo apoptótico evidenciado anteriormente e assim sugerindo que as aspartato proteases participam do disparo deste processo apoptótico. Em concordância a esta conclusão, a cepa FCF14 que é deficiente em proteinases e fosfolipases não induziu a exposição de Fosfatidilserina nos macrófagos após co-incubação (PANAGIO et al., 2002).

Entretanto, após 2h de co-incubação *in vitro*, foi observado que estas células não progrediram no processo apoptótico, mas entraram em necrose ou foram lisadas pela formação de hifas. Após estas observações, estudos sequenciais desenvolvidos *in vivo* e *ex vivo* pela nossa equipe utilizando a mesma cepa CR1 demonstraram que macrófagos coletados 30 minutos ou 2 horas após a infecção intraperitoneal apresentaram ligação à Anexina V-FITC. Considerando que a pré-incubação de *C. albicans* com a Pepstatina-A aboliu o processo de apoptose observado anteriormente, os resultados indicaram que as proteases liberadas pelo patógeno dentro da célula fagocítica participam da indução deste processo, em concordância com os resultados prévios *in vitro* (GASPAROTO et al., 2004). Os autores ainda observaram um aumento na produção de IL-10 após 24h de infecção com a cepa CR1, mas não após co-incubação com Pepstatina-A, sugerindo uma

possível relação do processo inicial de apoptose com o aumento na produção desta citocina por neutrófilos e consequente modulação de um padrão anti-inflamatório de resposta.

Geraldino e colaboradores (2010) demonstraram que a cepa CR15 também foi capaz de induzir apoptose das células fagocíticas de camundongos pré-tratados com PBS ou Con-A, e que este processo também foi abolido pela inibição das aspartato proteases com a utilização de Pepstatina-A. Uma vez que foi observada menor taxa de apoptose nos macrófagos ativados com Con-A, os resultados indicam que a capacidade de *C. albicans* induzir apoptose depende em parte do estado funcional dos macrófagos. De modo complementar, De Carvalho et al. (2011) evidenciou que esta mesma cepa CR15 foi capaz de induzir um aumento na produção de IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-17, bem como de IL-12 e IFN- $\gamma$  no exsudato peritoneal de camundongos pré-tratados com Con-A, sugerindo que esta lectina facilita o desencadeamento das respostas Th17 e Th1 levando à resolução da infecção.

#### 1.5 MORTE CELULAR POR APOPTOSE E INDUÇÃO DE RESPOSTA TH17

O processo de morte celular programada conhecido por Apoptose é um fenômeno em que a célula responde a estímulos ativando mecanismos que induzem sua morte. Tais estímulos podem ter origem exógena e assim agir em receptores de membrana da célula; ou origem endógena, sendo gerados após diferentes agressões como estresse oxidativo, agressão química, irradiação e hipóxia (BRASILEIRO FILHO, 2011). Enfim, a apoptose é um processo coordenado e muitas vezes dependente de energia, que envolve um grupo de cisteína proteases denominadas Caspases, e uma complexa cascata de eventos que ligam o estímulo inicial e a morte da célula (HELMORE, 2007).

A maioria das pesquisas indica que existem duas vias principais de apoptose a partir do estímulo inicial: a via extrínseca ou do receptor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. Porém, Igney e Krammer (2002) demonstraram evidências de que estas duas vias estão interligadas entre si, e que as moléculas de uma via são capazes de influenciar a outra. As duas vias convergem para um mesmo fim, conhecido como cascata de execução, que se inicia com a clivagem da caspase 3 e resulta na fragmentação do DNA, degradação do citoesqueleto e das

proteínas nucleares, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas e finalmente a fagocitose dessas células (revisado em HELMORE, 2007).

A via extrínseca de iniciação da apoptose envolve a ligação de ligantes específicos aos receptores de morte da família do rTNF (LOCKSLEY et al., 2001), sendo que atualmente os mais conhecidos ligantes e seus receptores são FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (revisado em HELMORE, 2007). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte localizados intracelularmente interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1, as quais têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 e conseqüentemente ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL et al., 2001).

A via intrínseca ou mitocondrial envolve uma série de estímulos não mediados por receptores que produzem sinais intracelulares que atuam diretamente em alvos dentro da célula. Esses eventos iniciados nas mitocôndrias podem ser ativados por estímulos negativos (ausência de fatores de crescimento, de hormônios e citocinas) que levam a uma falha na supressão do programa de morte. Outros estímulos, considerados positivos, incluem radiação, hipóxia, hipertermia, infecções virais entre outros, que ativam a via de morte. Todos esses estímulos causam alterações na membrana interna mitocondrial que resulta na abertura de um poro de transição de permeabilidade mitocondrial, perda do potencial transmembrana e liberação para o citoplasma de dois principais grupos de proteínas pró-apoptóticas, Citocromo c e SMAC ou DIABLO, normalmente sequestradas no espaço intermembrana (SAELENS et al., 2004). A liberação destas proteínas leva então a ativação das caspases que culmina na morte da célula.

Como já dito anteriormente, as duas vias terminam numa via final de execução, onde a ativação das caspases executoras leva a ativação de endonucleases citoplasmáticas que degradam o material nuclear e de proteases que degradam as proteínas nucleares e do citoesqueleto. As caspases 3, 6 e 7 atuam como executoras clivando vários substratos celulares e causando as mudanças morfológicas e bioquímicas observadas na apoptose (SLEE et al., 2001).

O reconhecimento de uma célula apoptótica pelas células fagocíticas adjacentes ocorre porque a célula em processo de morte expressa os chamados sinais “*eat me*”, como a exposição de Fosfatidilserina (FS) na face externa da

membrana plasmática, o que é capaz de ativar receptores como TIM-4, stabilin-2, BAI-1 e MER entre outros, na superfície de fagócitos como as DCs e macrófagos. Quando este processo de apoptose é fisiológico como na organogênese e hematopoiese normal, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros e no processo de envelhecimento celular, ocorre o que é chamado de fagocitose silenciosa destas células, onde o reconhecimento da célula apoptótica pelos fagócitos induz então uma resposta não inflamatória, caracterizada pela produção preferencial de TGF- $\beta$ , culminando na diferenciação de linfócitos Tregs que secretam mais citocinas anti-inflamatórias como o próprio TGF- $\beta$  e a IL-10 (RANGANATH; NAGASHREE, 2001; BRERETON; BLANDER, 2011; TORCHINSKY et al., 2009).

Desta forma, as células apresentadoras de antígenos (APCs) tem a capacidade de discriminar entre células em apoptose e patógenos devido ao tipo de PRRs a que estes se ligam durante a ativação da resposta imune inata (BLANDER; MEDZHITOV, 2006). Isso ocorre porque o reconhecimento da FS pelos fagócitos leva à ativação de PRRs considerados não inflamatórios, e induz a síntese de mediadores anti-inflamatórios como TGF- $\beta$ , IL-10, PGE2 e Fator Ativador Plaquetário (PAF) pelos macrófagos (FADOK et al., 1998). Este processo resulta em uma resposta silenciosa que leva à eliminação dos corpos apoptóticos sem que haja resposta inflamatória local, o que dá ao processo o nome comum de “fagocitose não inflamatória” (BRERETON; BLANDER, 2011).

Por outro lado, dois sinais são providos para as APCs durante o reconhecimento e a fagocitose de uma célula apoptótica em processos patológicos como, por exemplo, numa infecção. Sinais derivados da célula apoptótica ativam PRRs não-inflamatórios específicos para a fosfatidilserina na superfície da APC, e ligantes de TLR providos pelo patógeno invasor (PAMPs) se ligam aos TLR e induzem uma resposta pró-inflamatória. Esta combinação de sinais acaba por induzir a produção de IL-6, TGF- $\beta$ , e IL-23, perfil de citocinas que leva à diferenciação de células TCD4 *naïve* para a linhagem Th17 (BRERETON; BLANDER, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel específico da aspartato protease Sap9 na indução de apoptose de fagócitos peritoneais e sua relação com a produção de IL-17 durante infecção intraperitoneal por *Candida albicans*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a indução de apoptose em macrófagos peritoneais por diferentes cepas de *Candida albicans*;
- Verificar o envolvimento das Aspartato Proteases, especificamente Sap9 no processo de apoptose;
- Determinar o perfil de citocinas produzido em resposta à indução de apoptose durante o curso de infecção;
- Investigar a expressão de fatores de transcrição necessários para a indução de IL-17;
- Avaliar a indução de IL-17 pela Sap9 no fígado e exsudato peritoneal;
- Determinar o perfil de células do exsudato peritoneal após a infecção por *C. albicans*;
- Verificar a produção de IL-10 e IL-22 na fase tardia de infecção.

### **3 ARTIGO SUBMETIDO**

O artigo “Interleukin-17 is produced due to *Candida albicans* induced apoptosis by Aspartic-Protease 9” foi submetido para avaliação no periódico *Microbes and Infection*.

## Interleukin-17 is produced due to *Candida albicans* induced apoptosis by Aspartic-Protease 9

Gustavo Fernando da Silva Quirino<sup>a,b</sup>, Carina Zerbetto Segato-Vendrameto<sup>b</sup>, Tacito Graminha Campos<sup>b</sup>, Raquel Mitie Harano<sup>b</sup>, Ricardo Sérgio Almeida<sup>c</sup>, Ionice Felipe<sup>b\*</sup>

### ABSTRACT

Interleukin-17 (IL-17) has been widely related to protection during fungal infections. Therefore, this study evaluated whether the ability of *Candida albicans* to induce apoptosis of peritoneal macrophages is related to IL-17 production during the course of systemic candidiasis. Thus, after 30 min of *C. albicans* intraperitoneal inoculation in mice, induction of apoptosis occurred in approximately 60% of macrophages, assessed by staining with Annexin-V-FITC. The addition of pepstatin-A inhibited apoptosis, suggesting a role for aspartic proteases in this process. Likewise, the wild-type strain CAI-4 induced 55% apoptosis, whilst a strain lacking the aspartic protease 9 (*sap9Δ/Δ*) did not. The cytokines profile of wild-type strains (CR15 and CAI-4) shows the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  and IL-17, suggesting an activation of Th17 response during the course of infection. Moreover, the transcription factor ROR $\gamma$ t, which regulates Th17 activation, showed increased mRNA levels. The participation of Sap9 in apoptosis could also be linked to the triggering of Th17 activation, once pepstatin-A and *sap9Δ/Δ* strain presented a decreased IL-17 production. Additionally, in late infection phases, increased IL-10 and IL-22 levels were observed, possibly leading to tissue healing. Lastly, our data suggested that Sap9 is involved in macrophages apoptosis induction, triggering a Th17 response.

**Keywords:** *Candida albicans*. Immune response. IL-17. Apoptosis. SAP9.

---

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900 - 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Rod. Celso Garcia Cid km 380 - 86057-970 Londrina, PR, Brazil

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Rod. Celso Garcia Cid km 380 - 86057-970 Londrina, PR, Brazil

\* Corresponding author. Telephone: +55 43 3371 4616; fax: +55 43 3371 4267; e-mail: ionice@uel.br (Ionice Felipe).

## 1 INTRODUCTION

*Candida albicans* is a commensal fungus present asymptotically in mucocutaneous surfaces of approximately 65% of healthy individuals. However, during clinical episodes of immunosuppression, this opportunistic fungus can cause a variety of diseases, including candidemia, which is one of the most prevalent causes of disseminated fungal infection and is correlated with high levels of mortality [1]. Since this fungus can cause severe infections in immunosuppressed individuals, it is reasonable to conclude that the host immune response is crucial to maintaining *C. albicans* in its commensal form. Thus, several studies have addressed the role of innate and adaptive components of the immune system that could account for resistance against the virulence factors presented by this microorganism [2, 3].

*C. albicans* displays several adaptations for survival within the host, such as cellular dimorphism, host tissue adhesion and the secretion of phosphatases and proteases. Taken together, these virulence factors can lead to extensive cellular damage, which allows the fungus to invade the tissues and disseminate, and disrupt the local immune response [4, 5]. Several genes and molecules play a role during the infection process and special attention has been given to *C. albicans* secreted aspartic proteases (Sap). Ten isoforms of these enzymes are expressed by *C. albicans*. Of note, Sap1, 2 and 3 play a role in the yeast form of the fungus and are important for the phenotypic switch [6] and for reconstituted human vaginal epithelium (RHVE) infection [7]; Sap4, 5 and 6 are expressed in the hyphal form and play important roles during host tissue interaction [8] and systemic infections [9]. Current data show that Sap7 is a pepstatin-A insensitive protease [10], though its role during infection remains unclear [11], and that Sap8 shows greater expression during biofilm formation. Regarding Sap9 and 10, both are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases and play important roles in fungal physiology and host pathology. Moreover, *SAP9* is highly expressed during interaction with reconstituted human epithelium [12]. In addition, Sap9 and Sap10 are crucial to the budding process of the yeasts, and to the tissue adhesion and destruction processes [13].

Regarding the role of Sap9 during the interaction with host immune cells, it has been demonstrated that this enzyme mediates the interaction of *C. albicans* yeasts and filaments with human polymorphonuclear neutrophils (PMNs). Sap9 induces chemoattraction and the production of reactive oxygen species by

PMNs, culminating in the apoptosis of these cells. Moreover, the ability of PMNs to restrict filamentation was conserved in the absence of Sap9, however the candidacidal activity was suppressed, suggesting that this enzyme has a role in modulating the innate host cellular response to infection [14].

Key mediators of the host immune response during fungal infections were recently described, and Interleukin-17 (IL-17) is one of the most important. This cytokine is produced mainly by CD4<sup>+</sup> T cells, namely Th17. These cells are induced in the presence of IL-6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ , and further produce IL-17 and IL-22. Those cytokines then act on epithelial cells, which produce antimicrobial peptides, such as  $\beta$ -defensins, and CXC chemokines, which recruit neutrophils to the site of infection, controlling the fungal burden [15].

The factors that trigger IL-17 production and Th17 cells stability are yet to be fully understood. However, the retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ t) has been demonstrated to be the transcription factor responsible for IL-17 production, through its direct interaction with *il17* promoter [16, 17]. The regulation of IL-17 expression by ROR $\gamma$ t (or by its human correlate RORC2) has been demonstrated to occur in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells, innate and  $\gamma\delta$  T lymphocytes, as well as in invariant NKT cells [18-21].

Our group has already determined that apoptosis of phagocytic cells by *C. albicans* *in vitro* and *in vivo* is dependent on Sap activity, and correlates with IL-10 production after infection [22, 23]. Moreover, we have demonstrated that the protective effect of immunostimulant lectins, such as Con-A or ArtinM, during *C. albicans* infection was due to IL-17 production [24, 25]. In this work, we aimed to investigate the role of aspartic proteases, particularly Sap9, in the apoptosis induction of mouse peritoneal phagocytes and in the production of the protective cytokine IL-17.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 INFECTION OF MICE

Subgroups of 5 male Swiss mice, each weighing 28-32g and aged 4 to 6 weeks-old, received sterilized food and water *ad libitum*. The mice were infected intraperitoneally with one ml of *C. albicans* CR15 10<sup>7</sup>/PBS, wild type-strain CAI-4 and

mutant strain lacking the aspartic protease 9. One group of 5 noninfected mice was used as control. The ethics committee on animal experiments of Londrina State University approved the experiments.

## 2.2 FUNGAL CULTURE

*C. albicans* strain CR15 was isolated from the oral mucosa of a patient with HIV infection at the University hospital and maintained on Sabouraud dextrose agar. The isolates were used after two serial animal passages. For the experiments, *C. albicans* blastoconidia were obtained by growth in Sabouraud dextrose broth for 24 h at 28°C, harvested with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended at  $10^7$  blastoconidia in 1 ml of PBS. The wild-type strain CAI-4 and the mutant strain lacking the aspartic protease 9 (*sap9Δ/Δ*) were kindly provided by Dr. Bernhard Hube, Jena, Germany.

## 2.3 EX VIVO ASSAYS

After 0.5, 2, 6, 12, 18 and 24 hours, the mice were sacrificed and their peritoneal exudates were collected with 2 ml RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) pH 7.0 supplemented with 1% penicillin/streptomycin. For cytokine analysis, the supernatants were collected by centrifugation (800 *g* for 4 min at 4°C). Afterwards, the remaining pellets were resuspended in 1 ml RPMI medium (pH 7.0 supplemented with 5% inactivated fetal bovine serum plus 1% penicillin/streptomycin) to evaluate cell population of the peritoneal exudate cells.

## 2.4 EVALUATION OF PERITONEAL PHAGOCYtic CELLS

The peritoneal exudate cells collected following infection were adhered to coverslips (0.2 ml per coverslip) for 30 min at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The following tests were applied to the cells: (1) fixing in methanol followed by Giemsa staining (Merck, Darmstadt, Germany) and analysis by light microscopy to evaluate the populations of macrophages and neutrophils by counting 20 fields in immersion; (2) at 30 min postinfection, the adherent cells were stained with TACS Annexin-V-FITC kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) and 500nM DAPI

(Sigma, San Diego, CA) following fixation in 4% paraformaldehyde/PBS to evaluate the index of apoptotic cells. As a negative control (spontaneous apoptosis only), peritoneal exudates cells of noninfected mice were used. Analysis of fluorescence labeling was performed under a fluorescence microscope (Leica, DM 2000, AOTEC) by photographing the slide and using Leica Application Suite software. The images obtained were used to determine the apoptotic index by counting the number of cells in the field (DAPI<sup>+</sup>) and apoptotic cells in the same field (FITC<sup>+</sup>). The index was determined as % Apoptotic cells = (number of FITC<sup>+</sup> cells x 100) / total DAPI<sup>+</sup> cells.

## 2.5 CYTOKINES ASSAYS

To determine the concentrations of IL-17, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-22 and IL-10, supernatants (from peritoneal exudate) and tissue homogenates were submitted to capture ELISA procedures (eBioscience, San Diego, CA). The cytokine quantification assays were performed in accordance with the manufacturer's instructions.

## 2.6 RT-PCR FOR ROR $\gamma$ T AND IL-17

After 12 hours post *C. albicans* CR15 infection, the peritoneal exudate was collected and Trizol LS Reagent (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) was added to the cell pellets. RNA was extracted using SV Total RNA Isolation (ProMega-Wiscosin, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The mRNA was submitted to cDNA confection through transcriptase-reverse reaction using SuperScript<sup>TM</sup> III (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) (200 U/ $\mu$ l), in accordance with the manufacturer's instructions. The relative analysis of the transcripts was performed after real-time PCR in StepOnePlus<sup>TM</sup> RT-PCR Systems (Applied Biosystems, EUA) using SYBR Green technology. The results were normalized based on a house-keeping gene constitutive expression (GAPDH) followed by analysis of relative expression through  $\Delta\Delta$ Ct. The primers used were: GAPDH (F: 5'-CCACTCACGGCAAATTCAA-3' and R: 5'-GATGACAAGCTTCCCATTCTC-3'); IL-17 (F: 5'-TGCCCTCCACAATGAAAA GA-3' and R: 5'-AACACGAAGCAGTTTGGGAC-3') and ROR $\gamma$ t (F: 5'-TGGAAG ATGTGGACTTCGTTT-3' and R: 5'-TGGTCCCCCAAGTTCAGGAT-3').

## 2.7 STATISTICAL ANALYSIS

The differences between groups were analyzed using unpaired Student t test, except when time post-infection was a variable, where one-way ANOVA was applied. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

## 3 RESULTS

### 3.1 INDUCTION OF APOPTOSIS IS CRITICAL FOR STIMULATION OF IL-1 $\beta$ , IL-6 AND TGF- $\beta$ DURING *C. ALBICANS* INFECTION

Previously our group verified that *C. albicans* CR15 strain caused apoptosis of macrophages *in vitro* and during the course of infection [20]. Moreover, the infection triggered a protective Th17 immune response [18]. Thus, a fluorescence microscope analysis showed that the CR15 strain was able to induce apoptosis in approximately 60% of phagocytes when inoculated into the peritoneal cavity (Fig. 1A and B). The cytokines that polarize the Th17 response, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$ , were produced at the site of infection after the apoptotic process (Fig. 2). Our previously observation verified that *C. albicans* 577 strain did not induce apoptosis in macrophages [20] and was also unable to induce active IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and IL-6 production during the course of infection (data not shown).

### 3.2 *C. ALBICANS* INTRAPERITONEAL INFECTION TRIGGERS THE EXPRESSION OF ROR $\gamma$ T- AND IL-17-MRNA, INDUCING IL-17 PROTEIN SECRETION

The transcription factor ROR $\gamma$ t regulates the Th17 immune responses through transcriptional activation of cytokines, such as IL-17 [16]. After 12 hours of infection, there was a significant increase in both ROR $\gamma$ t- and IL-17-mRNA accumulation in the peritoneal exudate of infected mice compared to non-infected (Fig. 3A and B).

Although there are data implicating IL-17 and/or Th17 cells in immunity to *C. albicans* in various settings, its relative importance at different anatomic sites has not been fully elucidated. Thus, we evaluated IL-17 production in exudates of the peritoneal cavity and in the liver of infected mice, during the course of

infection. A significant increase in IL-17 production was observed at 18 h post-infection for both investigated sites (Fig. 3C and 3D).

### 3.3 DEVELOPMENT OF TH17 CELLS DEPENDS ON *C. ALBICANS* ASPARTIC PROTEASE ACTIVITY

Considering that *C. albicans* CR15 was able to cause apoptosis in macrophages and to trigger the production of cytokines and the transcription factor necessary for the development of Th17 cells, we investigated whether blockade of apoptosis could impair IL-17 production. Therefore, *C. albicans* CR15 was preincubated with pepstatin-A (125µg/5µl DMSO) for 15 min at 37°C before i.p. administration in mice, which resulted in the prevention of apoptosis (Fig. 4A and 4C). This was not restricted to the CR15 strain, since a wild-type strain CAI-4, which induces apoptosis in neutrophils [14], was also able to induce apoptosis in macrophages in the initial phase of infection (Fig. 4B and 4D). However, when a strain lacking *SAP9* gene (*sap9Δ/Δ*) was used, the apoptotic process was also prevented (Fig 4B and 4D), corroborating previous results that aspartic proteases could be related to the apoptosis of macrophages [17]. We next investigated whether impairing Saps activity (mainly Sap9) and, consequently, preventing apoptosis interfered in the production of IL-17. Accordingly, as shown in figure 5, both pepstatin-A and the lack of Sap9 significantly reduced IL-17 production in the peritoneal cavity and liver.

### 3.4 IL-10 AND IL-22 ARE INVOLVED IN LATER PHASE OF *C. ALBICANS* INFECTION

Given that infected apoptotic cells can drive development of Th17 cells, which in turn leads to inflammation, IL-10 could be produced as a regulatory component [22]. Thus, we analyzed IL-10 production over the course of *C. albicans* infection. A significant increase in this cytokine was verified in late phases of infection (24 h, Fig 6B), which correlated with a reduction in both macrophages and neutrophils influx into the peritoneal cavity (Fig 6A) and IL-17 production (Fig 3C). Since our group observed that the infection was not resolved by 72 h [23], we investigated whether IL-22 production increased the mechanisms of resistance in the

peritoneum. IL-22 was present at basal levels and increased significantly at 18 h postinfection, achieving maximum levels by 24 h (Fig 6C).

#### 4 DISCUSSION

Our group previously demonstrated that *C. albicans* was able to induce apoptosis *in vitro* [20] and induced a Th17 immune response *in vivo* [18]. Concanavalin-A administered three days before inoculum of *C. albicans* induced production of IL-17, but the pathogen by itself also triggered an increase in IL-17 levels. In this work, we investigated how the apoptotic process and a fungal aspartic protease could be interfering in the development of Th17 cells.

The evidence obtained in this study supports the hypothesis that apoptosis induced in macrophages by *C. albicans* CR15 effectively induced IL-1 $\beta$  production, whereas the 577 strain was unable to induce apoptosis or the production of IL-1 $\beta$  and IL-6 (data not shown). In addition to IL-6 and TGF- $\beta$  production, biologically active IL-1 $\beta$  occurred in the initial phase of *C. albicans* CR15 infection and all three were correlated to the development of Th17.

The Th17 lineage is a recently identified subset, which expresses high levels of IL-17 under the transcriptional regulation of ROR $\gamma$ t, which in this study, was expressed 12 h postinfection with *C. albicans* CR15. Together, TGF- $\beta$  and IL-6 can induce ROR $\gamma$ t expression, which promotes Th17 development [16]. In this study, IFN- $\gamma$  production was not detected (data not shown), but high levels of IL-17 were verified at 18 h postinfection in the peritoneal exudates and liver. Accordingly, in ROR $\gamma$ t deficient mice, naïve T cells were unable to differentiate into Th17 cells and showed no response to IL-23 induction [16].

Sap9 and Sap10 differ from other Saps in that they remain attached to the cell wall (Sap10) and the cell membrane (Sap9 and Sap10) [13]. Research has shown that *sap9* expression is necessary for efficient recognition and killing of *C. albicans* by human neutrophils. The apoptotic process triggered by Sap9 in neutrophils is the same mechanism that induces ROS production, whereas *sap9 $\Delta$ / $\Delta$*  mutant strain induces lower levels of neutrophil migratory activity, lower levels of ROS and reduced apoptosis [14]. In this work we used two different designs to identify the importance of the apoptotic process in the development of Th17 cells: (1) a mutant strain lacking the gene *sap9*; and (2) a patient isolate (CR15) co-incubated

with pepstatin-A to inhibit Saps activity. Thus, the wild-type (CAI-4) and *sap9Δ/Δ* strains were inoculated by peritoneal pathway to verify the occurrence of apoptosis in macrophages. Apoptosis was observed in macrophages inoculated by the wild-type, but not by *sap9Δ/Δ*, highlighting the crucial importance of the Sap9 molecule in interactions with macrophages. The second design was co-incubation of *C. albicans* CR15 with pepstatin-A (an inhibitor of aspartic proteases) before i.p. inoculum, which led to inhibition of the apoptotic process. These two designs clearly indicate that Sap9 is important for interacting with macrophages and its enzymatic activity is also crucial for inducing apoptosis, in agreement with previous observations [17]. The apoptotic process was correlated with Th17 development and the production of IL-17, in agreement with Torchinsky and colleagues (2009) [26]. When apoptosis was inhibited (pepstatin-A) or did not occur (*C. albicans* 577 strain, data not shown), a significant reduction in IL-17 production was observed in peritoneal exudates and liver.

We previously reported that *C. albicans* CR1 was able to induce apoptosis in peritoneal macrophages that was correlated with IL-10 production at 24h postinfection [23]. In addition pre-incubation of *C. albicans* CR1 with pepstatin-A reduced apoptosis and abolished the increase in IL-10 [23]. In this study, a significant increase in IL-10 was only observed in the later phase of infection and was correlated with reduced neutrophil migration and an increase in IL-22. This cytokine is known to contribute to antifungal resistance on mucosal surfaces by assuring epithelial integrity [27], and low levels of IL-22 are associated with chronic and recurrent mucosal candidiasis [28]. Our results suggest that IL-17 promotes protection and inflammation, while IL-10 fine-tunes the immune response to prevent damage to the host. Additionally, in late infection phases, increased IL-10 and IL-22 levels were observed as the inflammatory exudate decreased, possibly leading to tissue healing.

Taken together, our data defines a mechanism in which tissue or cellular damage induced by microbial virulence factors, such as aspartic proteases, trigger an inflammatory protective role mediated by IL-17, which acts in concert with IL-22 to prevent fungal infection. Lastly, our data suggested that Sap9 is involved in macrophages apoptosis induction, triggering a Th17 response. Thus, resistance to microbial virulence factors and tolerance to tissue damage are complementary host defense mechanisms that likely operate during disseminated fungal infections.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Hube for kindly providing *C. albicans* CAI-4 and *sap9Δ/Δ* strains used in this study. We also thank Tiago Medina and João Santana Silva for providing material and technical support during RT-PCR performance. This study was supported by Fundação Araucária (460/2010). G.F.S.Q. and R.M.H. were supported by fellowships from CNPq. C.Z.S.V. and T.G.C. were supported by fellowships from CAPES.

## REFERENCES

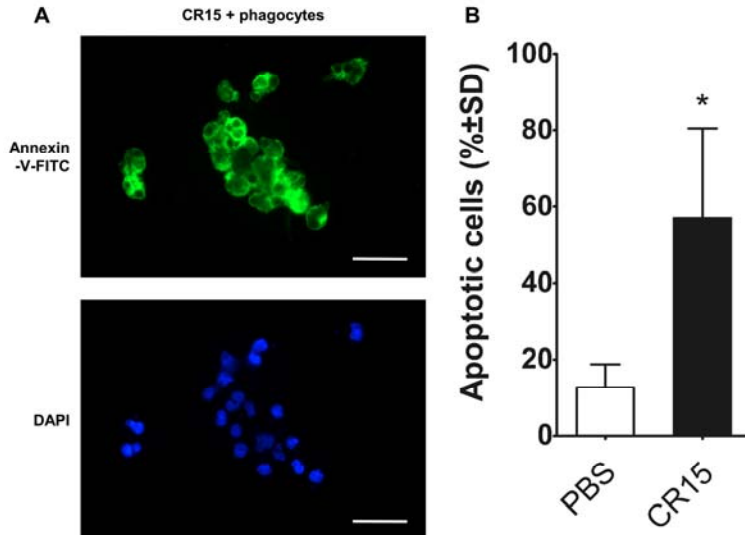
- [1] Pfaller MA, Diekema DJ, Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem, *Clin Microbiol Rev* 20 (2007) 133-163.
- [2] Gauglitz GG, Callenberg H, Weindl G, Korting HC, Host defence against *Candida albicans* and the role of pattern-recognition receptors, *Acta Derm Venereol* 92 (2012) 291-298.
- [3] Gow NA, Hube B, Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection, *Curr Opin Microbiol* 15 (2012) 406-412.
- [4] Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards JE, Jr., Filler SG, Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells, *PLoS Biol* 5 (2007) e64.
- [5] Zakikhany K, Thewes S, Wilson D, Martin R, Albrecht A, Hube B, From attachment to invasion: infection associated genes of *Candida albicans*, *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of med mycol* 49 (2008) 245-251.
- [6] White TC, Agabian N, *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors, *J Bacteriol* 177 (1995) 5215-5221.
- [7] Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B, The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium, *Infect & Immun* 71 (2003) 3227-3234.
- [8] Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M, The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages, *Mol Microbiol* 28 (1998) 543-554.
- [9] Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schafer W, Hube B, *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs, *Infect & Immun* 70 (2002) 3689-3700.

- [10] Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Yamamoto Y, Kuroda K, Ueda M, *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease, PLoS ONE 7 (2012) e32513.
- [11] Taylor BN, Hannemann H, Sehnal M, Biesemeier A, Schweizer A, Rollinghoff M, Schroppel K, Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice, Infect & Immun 73 (2005) 7061-7063.
- [12] Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihklaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B, Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis, Microbiol 154 (2008) 3266-3280.
- [13] Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schafer W, Klis F, Monod M, Hube B, Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions, J Biol Chem 281 (2006) 688-694.
- [14] Hornbach A, Heyken A, Schild L, Hube B, Loffler J, Kurzai O, The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils, Infect & Immun 77 (2009) 5216-5224.
- [15] Hernandez-Santos N, Gaffen SL, Th17 cells in immunity to *Candida albicans*, Cell Host Microbe 11 (2012) 425-435.
- [16] Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR, The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells, Cell 126 (2006) 1121-1133.
- [17] Chatterjee M, Hedrich CM, Rauen T, Ioannidis C, Terhorst C, Tsokos GC, CD3-T cell receptor co-stimulation through SLAMF3 and SLAMF6 receptors enhances ROR $\gamma$  recruitment to the IL17A promoter in human T lymphocytes, J Biol Chem 287 (2012) 38168-38177.
- [18] Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK, The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells, Eur J Immunol 39 (2009) 1480-1493.
- [19] Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hunig T, Mittrucker HW, Brustle A, Kamradt T, Lohoff M, A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity, Eur J Immunol 39 (2009) 1716-1725.
- [20] Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA, Becher B, ROR $\gamma$ + innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells initiate psoriasisiform plaque formation in mice, J Clin Invest 122 (2012) 2252-2256.

- [21] Doisne JM, Becourt C, Amniai L, Duarte N, Le Luduec JB, Eberl G, Benlagha K, Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor ( $\gamma$ )<sup>t+</sup> and respond preferentially under inflammatory conditions, *J Immunol* (2009) 2142-2149.
- [22] Panagio LA, Felipe I, Vidotto MC, Gaziri LC, Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual, *J Med Microbiol* 51 (2002) 929-936.
- [23] Gasparoto TH, Gaziri LC, Burger E, de Almeida RS, Felipe I, Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10, *FEMS Immunol Med Microbiol* 42 (2004) 219-224.
- [24] de Carvalho PG, Custodio LA, Conchon-Costa I, Andrade CG, Quirino GF, de Almeida RS, Felipe I, Concanavalin-A induces IL-17 production during the course of *Candida albicans* infection, *FEMS Immunol Med Microbiol* 64 (2012) 273-279.
- [25] Custodio LA, Loyola W, Conchon-Costa I, da Silva Quirino GF, Felipe I, Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*, *Int Immunopharmacol* 11 (2011) 1510-1515.
- [26] Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM, Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation, *Nat* 458 (2009) 78-82.
- [27] De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, Iannitti RG, Bonifazi P, Renauld JC, Bistoni F, Puccetti P, Romani L, IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance, *Mucosal Immunol* (2010) 361-373.
- [28] De Luca A, Carvalho A, Cunha C, Iannitti RG, Pitzurra L, Giovannini G, Mencacci A, Bartolommei L, Moretti S, Massi-Benedetti C, Fuchs D, De Bernardis F, Puccetti P, Romani L, IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis, *PLoS Pathog* (2013) e1003486.

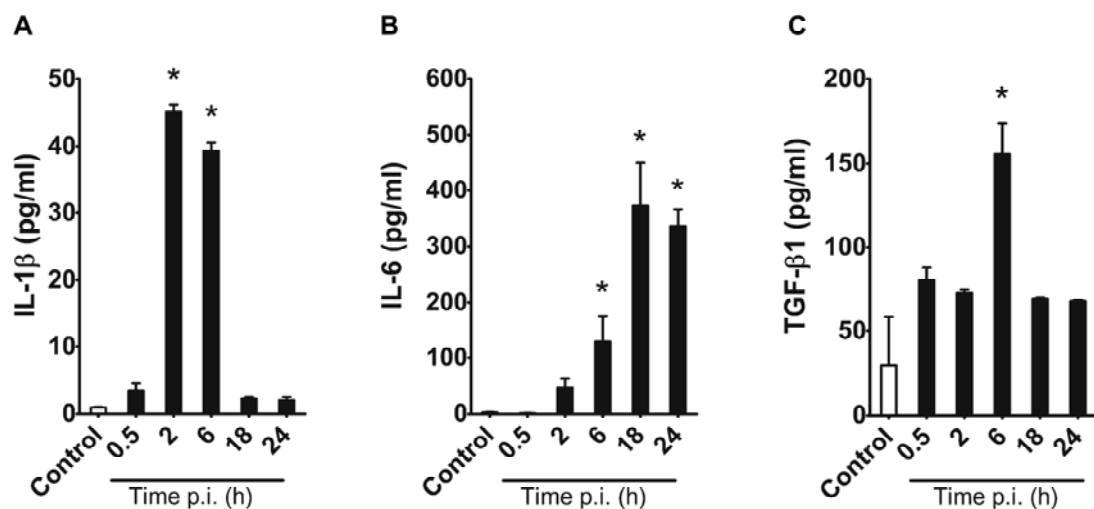
## FIGURES

**Fig. 1** – Induction of apoptosis in macrophages by *C. albicans* CR15.



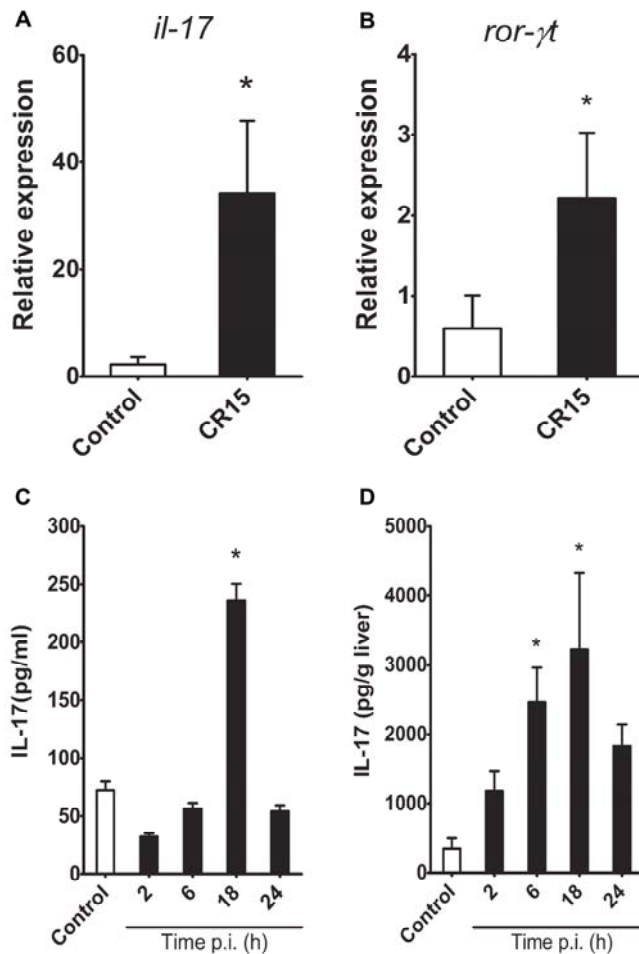
At 30 min postinfection, peritoneal exudates were centrifuged and incubated for 30 min in RPMI supplemented with 5% FCS and washed to elimination of the nonadherent cells. Next, they were stained with TACS Annexin V-FITC and fixed in 1% paraformaldehyde to evaluate the index of apoptotic cells. As negative control (spontaneous apoptosis only), peritoneal exudate cells of non-infected mice were used. Analysis of fluorescence labeling was performed under a fluorescence microscope (Leica) by photographing the fields and using Leica Application Suite software. The images (A) obtained were used to determine the apoptotic index (B) by counting the number of cells in the field (DAPI+) and apoptotic cells in the same field (FITC+). The index was determined as % Apoptotic cells = (number of FITC<sup>+</sup> cells x 100) / total DAPI<sup>+</sup> cells. \*p < 0.05, CR15 vs PBS. Bars indicate 25  $\mu$ m.

**Fig. 2** – IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$  production by peritoneal exudate cells during *C. albicans* CR15 infection.



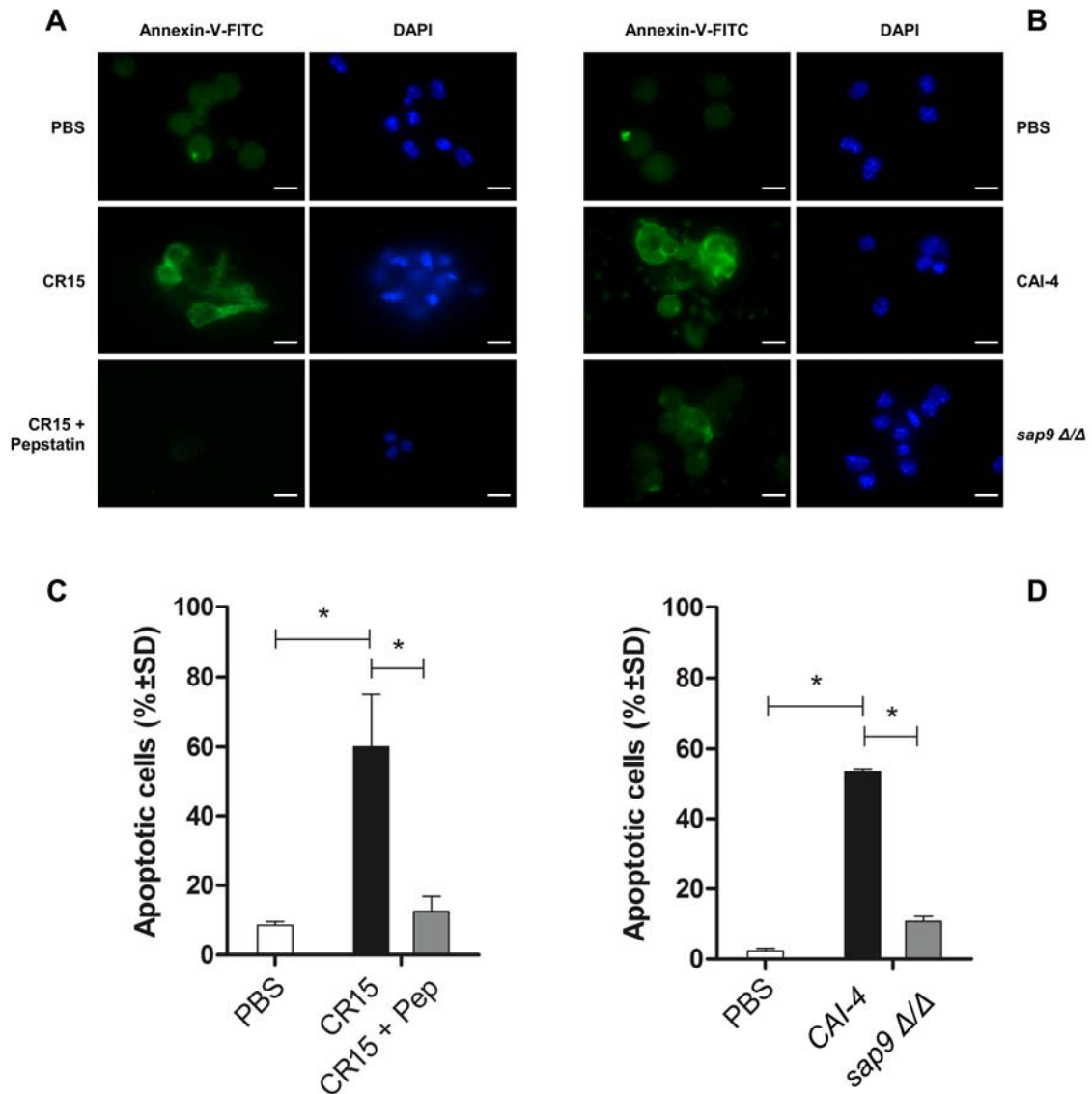
Mice were inoculated with  $10^7$  *C. albicans* CR15/1 ml PBS. The amounts of IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) and TGF- $\beta$  (C) in the supernatants from peritoneal exudates were determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate, and the results represent the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. \*p < 0.05 CR15 vs. control.

**Fig. 3** – Expression of mRNA for IL-17, ROR $\gamma$ t and amount of IL-17 produced in peritoneal exudates and liver.



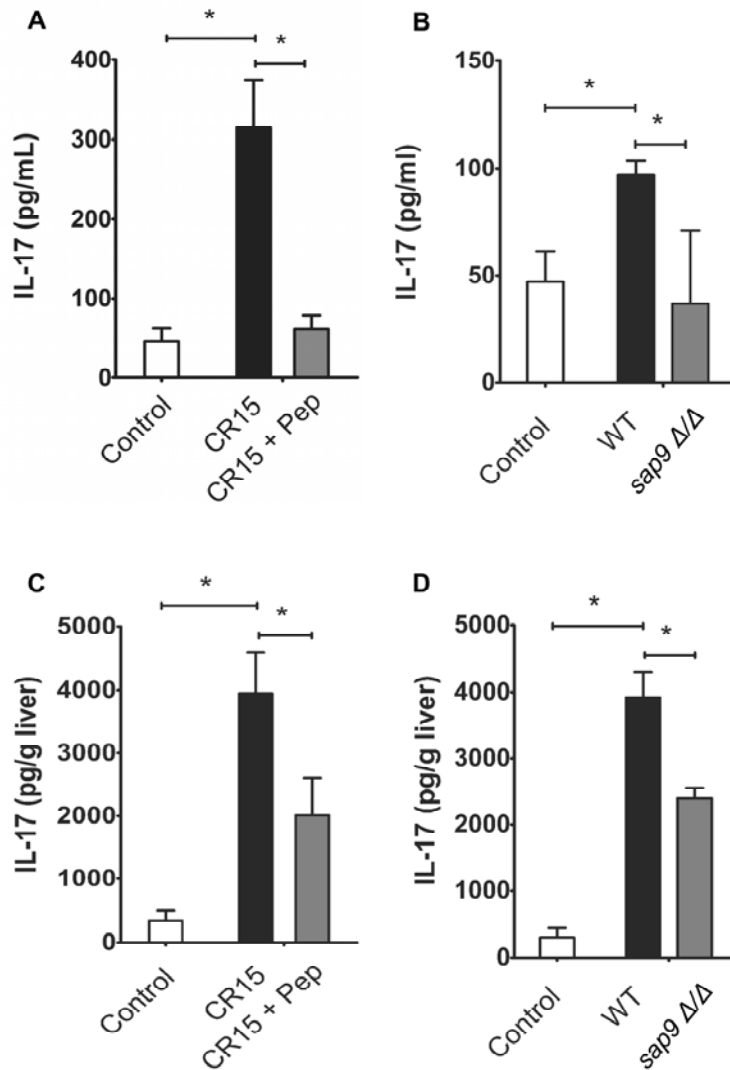
Real-time PCR was performed to determine the relative levels of mRNA for IL-17 (A) and ROR $\gamma$ t (B) expressed by peritoneal cells from infected mice with *C. albicans* CR15 for 12 h. The results were normalized based on a house-keeping gene constitutive expression (GAPDH) followed by analysis of relative expression through  $\Delta\Delta C_t$ . The data represent the mean  $\pm$  SD of three experiments. IL-17 production in the peritoneal exudate (C) and liver (D). The mice were inoculated with *C. albicans* CR15 and during the infection, the supernatants from each peritoneal exudate and macerated liver were collected and IL-17 determined by ELISA. Assays were performed in duplicate, and the results represent the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. \*Statistically significant at  $p < 0.05$  for infected vs. control.

**Fig. 4** – Effect of pepstatin-A and aspartic protease-9 on the induction of apoptosis in macrophages by *C. albicans*.



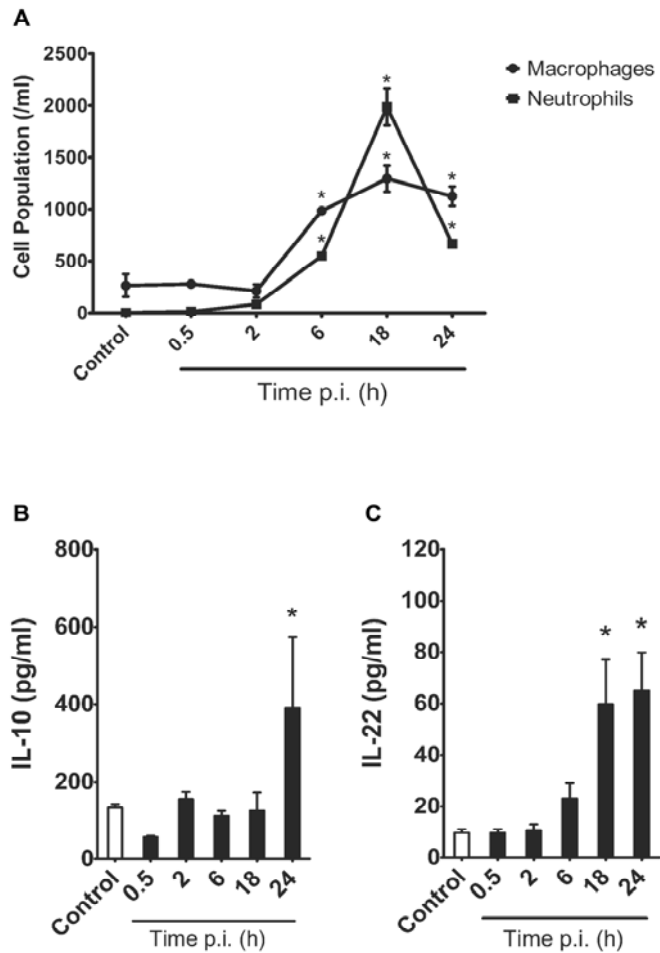
(A) The presence of pepstatin-A (125 $\mu$ g/5 $\mu$ l DMSO) in the inoculum of *C. albicans* CR15/1 ml PBS significantly prevented apoptosis. (B) CAI-4 wild-type strain induced apoptosis at similar levels to CR15, while the *sap9* $\Delta/\Delta$  mutant induced lower levels of apoptosis. (C) Apoptotic index after infection with CR15 in the absence or presence of pepstatin-A and (D) after infection with CAI-4 (wild-type) or *sap9* $\Delta/\Delta$ . \*Statistically significant at  $p < 0.05$ . Bars indicate 10  $\mu$ m.

**Fig. 5** – Effect of pepstatin-A and aspartic protease 9 on IL-17 production in peritoneal exudates (A and B) and liver (C and D).



The mice were inoculated with 1 ml  $10^7$  *C. albicans* CR15/PBS, with or without pepstatin-A (Pep) (125 $\mu$ g/5 $\mu$ l DMSO) (A and C). Additionally, mice were inoculated with 1 ml  $10^7$  *C. albicans* CAI-4 (WT) or *sap9* $\Delta/\Delta$  mutant (B and D). The amount of IL-17 from supernatants of peritoneal exudates or liver was determined by capture ELISA. Assays were performed in duplicate, and the results represent the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. \*p < 0.05, infected vs. non-infected groups.

**Fig.6** – Inflammatory influx into the peritoneal cavity and production of IL-10 and IL-22 during *C. albicans* infection.



Mice were infected with  $10^7$  CR15 yeasts and peritoneal exudate was collected, centrifuged and cells were distributed in coverslips to be further stained with Giemsa. The population of macrophages and neutrophils (A) were determined through counting of 20 fields in light microscope. (B) IL-10 and IL-22 levels during infection were determined by ELISA assay. Assays were performed in duplicate, and the results represent the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. \* $p < 0.05$ , infected vs. non-infected group.

## 4 CONCLUSÃO

Observando os resultados obtidos com a realização deste trabalho é possível sugerir que o dano celular ou tecidual induzido por fatores de virulência dos micro-organismos, como as SAPs por exemplo, ativam uma resposta inflamatória protetora mediada pela IL-17, e que a proteína Sap9 está diretamente envolvida na indução de apoptose em macrófagos peritoneais, ativando a resposta Th17.

Assim, é possível concluir que a resistência aos fatores de virulência e a tolerância ao dano tecidual são mecanismos complementares da defesa do hospedeiro que provavelmente operam em conjunto durante infecções fúngicas disseminadas visando o controle do crescimento do agente agressor sem sua completa eliminação, e a limitação da injúria aos tecidos do hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- AGRAWAL, B.B.; GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. **Biochimica et Biophysica Acta**. 23;147(2):262–271. 1967.
- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICHOVA, I.; NAGLIK, J.R.; SCHALLER, M.; GROOT, P.; MACCALLUM, D.; ODDS, F.C.; SCHAFFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **Journal of Biological Chemistry**. 281:688–694. 2006.
- AMSEN, D.; SPILIANAKIS, C.G.; FLAVELL, R.A. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? **Current Opinion in Immunology**. 21:153–160. 2009.
- ANDERSSON, J.; MELCHERS, F.: Lymphocyte stimulation by Con A. In: **Concanavalin A as a Tool**. eds. H. Bittiger, H.P. Schnebli, pp. 505-522, J. Wiley and Sons, London, 1976.
- AOKI, W.; KITAHARA, N.; MIURA, N.; MORISAKA, H.; YAMAMOTO, Y.; KURODA, K.; UEDA, M. *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease. **Plos One**. 7. 2012.
- ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Oral candidal populations in health and disease. **British Dental Journal**. 147:267–272. 1979.
- BEAUSÉJOUR, A.; GRENIER, D.; GOULET, J.P.; DESLAURIERS, N. Proteolytic Activation of the Interleukin-1b Precursor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**. 66(2):676. 1998.
- BELLOCCHIO, S.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; MAMBULA, S.S.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; LEVITZ, S.M.; ROMANI, L. The contribution of Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **Journal of Immunology**. 172:3059–3069. 2004.
- BI, L.; GOJESTANI, S.; WU, W.; HSU, Y.M.; ZHU, J.; ARIIZUMI, K.; LIN, X. CARD9 mediates dectin-2-induced I $\kappa$ B kinase ubiquitination leading to activation of NF- $\kappa$ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**. 285: 25969–25977. 2010.
- BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. **Nature Immunology**. 7: 1029–1035. 2006.
- BONIFAZI, P.; ZELANTE, T.; D'ANGELO, C.; DE LUCA, A.; MORETTI, S.; BOZZA, S.; PERRUCCIO, K.; IANNITTI, R.G.; GIOVANNINI, G.; VOLPI, C.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*. **Mucosal Immunology**. 2: 362–374. 2009.

- BORG-VON ZEPELIN, M.; BEGGAH, S.; BOGGIAN, K.; SANGLARD, D.; MONOD, M. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Molecular Microbiology**. 28:543-554. 1998.
- BRAGA-SILVA, L.A.; SANTOS, A.L.S. Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. **Current Medicinal Chemistry**. 18: 2401–19. 2011.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BRERETON, C.F.; BLANDER, J.M. The unexpected link between infection induced apoptosis and a Th17 immune response. **Journal of Leukocyte Biology**. Volume 89. April 2011.
- CADICAMO, C.D.; MORTIER, J.; WOLBER, G.; HELL, M.; HEINRICH, I.E.; MICHEL, D.; SEMLIN, L.; BERGER, U.; KORTING, H.C.; HÖLTJE, H.D. KOKSCH, B.; BORELLI, C. Design, synthesis, inhibition studies, and molecular modeling of pepstatin analogues addressing different secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*. **Biochemical Pharmacology**. 85: 881–887. 2013.
- CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. 9: 327–335. 2001.
- CAMBI, A.; NETEA, M.G.; MORA-MONTES, H.M.; GOW, N.A.; HATO, S.V.; LOWMAN, D.W.; KULLBERG, B.J.; TORENSMA, R.; WILLIAMS, D.L.; FIGDOR, C.G. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on Nlinked mannan. **Journal of Biological Chemistry**. 283: 20590–20599. 2008.
- CELLA, M.; FUCHS, A.; VERMI, W.; FACCHETTI, F.; OTERO, K.; LENNERZ, J.K.; DOHERTY, J.M.; MILLS, J.C.; COLONNA, M. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. **Nature**. 457:722–725. 2009
- CHATTERJEE, M.; HEDRICH, C.M.; RAUEN, T.; IOANNIDIS, C.; TERHORST, C.; TSOKOS, G.C. CD3-T cell receptor co-stimulation through SLAMF3 and SLAMF6 receptors enhances ROR $\gamma$  recruitment to the IL-17A promoter in human T lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**. 287:38168-38177. 2012.
- CHENG, S.C.; VAN, DE VEERDONK, F.L.; LENARDON, M.; STOFFELS, M.; PLANTINGA, T.; SMEEKENS, S.; RIZZETTO, L.; MUKAREMERA, L.; PREECHASUTH, K.; CAVALIERI, D.; KANNEGANTI, T.D.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J.; JOOSTEN, L.A.; GOW, N.A.; NETEA, M.G. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. **Journal of Leukocyte Biology**. 90:357–366. 2011.
- CHUNG, Y.; CHANG, S.H.; MARTINEZ, G.J.; YANG, X.O.; NURIEVA, R.; KANG, H.S.; MA, L.; WATOWICH, S.S.; JETTEN, A.M.; TIAN, Q.; DONG, C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**. 30:576–587. 2009.

- COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide Sentinel surveillance of candidemia in eleven Medical Centres. **Journal of Clinical Microbiology**. 44: 2816–2823. 2006.
- CONCHON-COSTA, I.; LOYOLA, W.; GAZIRI, L.C.J.; CUSTODIO, L.A.; FELIPE, I. Low dose of Concanavalina-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 2007.
- CONTI, H.R.; SHEN, F.; NAYYAR, N.; STOCUM, E.; SUN, J.N.; LINDEMANN, M.J.; HO, A.W.; HAI, J.H.; YU, J.J.; JUNG, J.W.; FILLER, S.G.; MASSO-WELCH, P.; EDGERTON, M.; GAFFEN, S.L. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **Journal of Experimental Medicine**. 206: 299–311. 2009.
- CONTI, H.R.; GAFFEN, S.L. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. **Microbes and Infection**. 2010.
- CORNER, B.E.; MAGEE, P.T. *Candida* pathogenesis: Unravelling the threads of infection. **Current Biology**. 7(11). 1997.
- CUA, D.J.; TATO, C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**. 10. Jul. 2010.
- CUSTODIO, L.A.; LOYOLA, W.; CONCHON-COSTA, I.; QUIRINO, G.F.S.; FELIPE, I. Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**. 11:1510-1515. 2011.
- CUTFIELD, S.M.; DODSON, E.J.; ANDERSON, B.F.; MOODY, P.C.E.; MARSHALL, C.J.; SULLIVAN, P.A.; CUTFIELD, J.F. The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. **Structure**. 3: 1261–71. 1995.
- CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**. 45:187–218. 1991.
- CYPOWYJ, S.; PICARD, C.; MARODI, L.; CASANOVA, J.; PUEL, A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. **European Journal of Immunology**. 42: 2246–2254. 2012.
- DALLE, F.; WACHTLER, B.; L'OLLIVIER, C.; HOLLAND, G.; BANNERT, N.; WILSON, D.; LABRUÈRE, C.; BONNIN, A.; HUBE, B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cell Microbiology**. 12: 248–71. 2010.
- DANIEL, P.T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**. 15:1022-1032. 2001.

- DENNING, T. L.; WANG, Y. C.; PATEL, S. R.; WILLIAMS, I. R.; PULENDRAN, B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. **Nature Immunology**. 8(10): 1086-1094. 2007.
- DE ANDRADE, G.M.; FELIPE, I. Evidence for the participation of proteinases released by *Candida albicans* in the early killing of peritoneal macrophages in vitro. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. 25: 167–174. 1992.
- DE BERNARDIS, F.; BOCCANERA, M.; ADRIANI, D.; SPREGHIHI, E.; SANTONI, G.; CASSONE, A. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. **Infection and Immunity**. 65: 3399–405. 1997.
- DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILAN, R.; PONTON, J.; CASSONE, A. Biotyping, virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**. 37: 3481–6. 1999.
- DE CARVALHO, P.G.; CUSTODIO, L.A.; CONCHON-COSTA, I.; ANDRADE, C.G.; QUIRINO, G.F.S.; DE ALMEIDA R.S.; FELIPE, I. Concanavalin-A induces IL-17 production during the course of *Candida albicans* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 64: 273-279. 2012.
- DE LUCA, A.; ZELANTE, T.; D'ANGELO, C.; ZAGARELLA, S.; FALLARINO, F.; SPRECA, A.; IANNITTI, R.G.; BONIFAZI, P.; RENAULD, J.C.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. **Mucosal Immunology**. 3:361–373. 2010.
- DE LUCA, A.; CARVALHO, A.; CUNHA, C.; IANNITTI, R.G.; PITZURRA, L.; GIOVANNINI, G.; MENCACCI, A.; BARTOLOMMEI, L.; MORETTI, S.; MASSI-BENEDETTI, C.; FUCHS, D.; BERNARDIS, F. de; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. IL-22 and IDO1 Affect Immunity and Tolerance to Murine and Human Vaginal Candidiasis. **PLOS Pathogens**. Volume 9. July 2013.
- DINARELLO, C.A. The biological properties of interleukin-1. **European Cytokine Network**. 5: 517–531.1994.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1beta. **Critical Care Medicine**. 33: S460–S462. 2005.
- EISENHABER, B.; SCHNEIDER, G.; WILDPANER, M.; EISENHABER, F. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Molecular Biology**. 337: 243–253. 2004.
- EYERICH, S.; WAGENER, J.; WENZEL, V.; SCARPONI, C.; PENNINO, D.; ALBANESI, C.; SCHALLER, M.; BEHRENDT, H.; RING, J.; SCHMIDT-WEBER, C.B.; CAVANI, A.; MEMPEL, M.; TRAILD-HOFFMANN, C.; EYERICH, K. IL-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. **European Journal of Immunology**. 41: 1894–1901. 2011.

- FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit pro-inflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2, and PAF. **Journal of Clinical Investigation**. 101:890–898. 1998.
- FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAUER, S.; NICTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and Immunity**. 70: 3689–700. 2002.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O’GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**. 147:3815–3822. 1991.
- FRANCHI, L.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NÚÑEZ, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. **Nature Immunology**. 13:325–332. 2012.
- FREIRE DE LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.P.; BOZZA, P.T.; CASTRO FARIA NETO, H.C.; DE MELLO, F.; DOS REIS, G.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic *Trypanosome* in macrophage. **Nature**. 403: 199–203. 2000.
- GAFFEN, S.L.; HERNANDEZ-SANTOS, N.; PETERSON, A.C. IL-17 Signaling in Host Defense Against *Candida albicans*. **Immunologic Research**. 50(2-3): 181–187. Aug. 2011.
- GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **Journal of Experimental Medicine**. 197:1107–1117. 2003.
- GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; UNDERHILL, D.M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **EMBO Journal**. 24: 1277–1286. 2005.
- GASPAROTO, T.H.; GAZIRI, L.C.; BURGER, E.; DE ALMEIDA, R.S.; FELIPE, I. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 42: 219–224. 2004.
- GAUGLITZ, G.G.; CALLENBERG, H.; WEINDL, G.; KORTING, H.C. Host defence against *Candida albicans* and the role of pattern-recognition receptors. **Acta Dermato Venereologica**. 92:291-298. 2012.
- GERALDINO, T.H.; DE VITO, E.; CUTÓDIO, L.A.; CONCHON-COSTA, I.; GAZIRI, L.C.J.; FELIPE, I.; LOYOLA, W.; BONIFÁCIO, K.L. Increased tumour necrosis factor- $\alpha$  production, higher mannose receptor activity and ability to kill *Candida* by concanavalin-A activated macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 59: 11–17. 2010.
- GESSNER, M.A.; WERNER, J.L.; LILLY, L.M.; NELSON, M.P.; METZ, A.E.; DUNAWAY, C.W.; CHAN, Y.R.; OUYANG, W.; BROWN, G.D.; WEAVER, C.T.;

STEELE, C. Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**. 80: 410–417. 2012.

GLOCKER, E; GRIMBACHER, B; Chronic mucocutaneous candidiasis and congenital susceptibility to *Candida*. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. 10(6): 542-550. 2010.

GOW, N.A.; VAN DE VEERDONK, F.L.; BROWN, A.J.; NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Review Microbiology**. 2011.

GOW, N.A.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current Opinion in Microbiology**. 15:406-412. 2012.

GREENSPAN, D.; GREENSPAN, J.S.; SCHIODT, M.; PINDBORG, J.J. AIDS and the mouth. **Copenhagen**. p.85-90. 1990.

GRINGHUIS, S.I.; KAPTEIN, T.M.; WEVERS, B.A.; THEELEN, B.; VAN DER VLIST, M.; BOEKHOUT, T.; GEIJTENBEEK, T.B. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nature Immunology**. 13(3): 246-54. 2012.

GROPP, K.; SCHILD, L.; SCHINDLER, S.; HUBE, B.; ZIPFEL, P.F.; SKERKA, C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. **Molecular Immunology**. 47:465–75. 2009.

HAN, K.H.; PARK, S.J.; CHOI, S.J.; PARK, J.Y.; LEE, K.H. Immunological Features of Macrophages Induced by Various Morphological Structures of *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23(7):1031–1040. 2013.

HELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**. 35(4): 495–516. 2007.

HERNÁNDEZ-SANTOS, N.; GAFFEN, S.L. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. **Cell Host Microbe**. 11(5): 425–435. May, 17, 2012.

HISE, A.G.; TOMALKA, J.; GANESAN, S.; PATEL, K.; HALL, B.A.; BROWN, G.D.; FITZGERALD, K.A.; An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Cell Host Microbe**. 5:487–497. 2009.

HORNBACH, A.; HEYKEN, A.; SCHILD, L.; HUBE, B.; LOFFER, J.; KURZAI, O. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils. **Infection and Immunity**. 77(12): 5216–5224. Dec. 2009.

HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P.L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. **Journal of Infectious Disease**. 190: 624–631. 2004.

IBATA-OMBETTA, S.; TRINEL, P.A.; POULAIN, D.; JOUALT, T. *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeast through modulation of

- bad phosphorylation and macrophage apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**. 278: 13086–13093. 2003.
- IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Review Cancer**. 2: 277–88. 2002.
- ISMAIL, N.; OLANO, J.P.; FENG, H.; WALKER, D.H. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. 207(2):111-120. 2002.
- IVANOV, I.I.; MCKENZIE, B.S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C.E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J.J.; CUA, D.J.; LITTMAN, D.R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**. 126: 1121–1133. 2006.
- JACOBSEN, I.D.; WILSON, D.; WACHTLER, B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J.R. HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 10:85–9. 2012.
- JOUAULT, T.; IBATA-OMBETTA, S.; TAKEUCHI, O.; TRINEL, P.A.; SACCHETTI, P.; LEFEBVRE, P.; AKIRA, S.; POULAIN, D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. **Journal of Infectious Disease**. 188:165–172. 2003.
- KAMINISHI, H.; TANAKA, M.; CHO, T.; MAEDA H.; HAGIHARA, Y. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. **Infection and Immunity**. 58:2139–2143. 1990.
- KAMINISHI, H.; MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infection and Immunity**. 63: 984–988. 1995.
- KATAOKA, K.; MUTA, T.; YAMAZAKI, S.; TAKESHIGE, K. Activation of macrophages by linear (1→3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. **Journal of Biological Chemistry**. 277: 36825-36831. 2002.
- KLATT, N.R.; BRENCHLEY, J.M. Th17 cell dynamics in HIV infection. **Current Opinion in HIV and AIDS**. 5: 135-140. 2010.
- KLIS, F.M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Medical Mycology**. 39(Suppl.1):1–8. 2001.
- KOBAYASHI, S.D.; CUTLER, J.E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? **Trends in Microbiology**. 6: 92–94. 1998.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JAGER, A.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells. **Nature**. 448:484–487. 2007.
- KRETSCHMAR, M.; HUBE, B.; BERTSCH, T.; SANGLARD, D.; MERKER, R.; SCHRÖDER, M.; HOF, H.; NICHTERLEIN, T. Germ tubes and proteinase activity

contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infection and Immunity**. 67: 6637–42. 1999.

LACAZ, C. S. Tratado de Micologia Médica: LACAZ. São Paulo: Editora Sarvier. 2002.

LILIC, D.; GRAVENOR, I.; ROBSON, N.; LAMMAS, D.A.; DRYSDALE, P.; CALVERT, J. E.; CANT, A. J.; ABINUN, M. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Infection and Immunity**. 71(10): 5690-5699. 2003.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; GROSS, O.; ROBINSON, M.J.; OSORIO, F.; SLACK, E.C.; TSONI, S.V.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G.D.; RULAND, J.; REIS E SOUSA, C. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature Immunology**. 8(6): 630-8. Jun, 2007.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**. 104: 487–501. 2001.

LOYOLA, W.; GAZIRI, D.A.; GAZIRI, L.C.J.; FELIPE, I. Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 33: 201–208. 2002.

LOYOLA, W.; CUSTODIO, L. A.; FELIPE, I.; CONCHON-COSTA, I.; CARVALHO, P.G.; QUIRINO, G.F.S.; SILVA, L.F.R.S.; GAZIRI, L.C. Artin M enhances TNF- $\alpha$  production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. **International Immunopharmacology**. 12: 378–383. 2012.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; O'QUINN, D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WAHL, S.M.; SCHOEB, T.R.; WEAVER, C.T. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the Th17 lineage. **Nature**. 441: 231–234. 2006.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MONTEOLIVA, L.; PLA, J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA, C. *Candida albicans*, genetics, dimorphism and pathogenicity. **International Microbiology**. 1:95-106. 1998.

MONOD, M.; HUBE, B.; HESS, D.; SANGLARD, D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology**. 144: 2731–2737. 1998.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**. 19:683–765. 2001.

MORESCO, T.R.; GAZIRI, L.C.J.; YASUMOTO, Y.; FELIPE, I. Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with Concanavalin-A. **Medical Mycology**. 40:393–397. 2002.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. Manual Of Clinical Microbiology. 8<sup>a</sup> ed., **Washington D.C. ASM Press**. 2006.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 67: 400–428. 2003.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**. 6: 915–926. 2004.

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A.R.; RODGERS, C.A.; WOODMAN, A.J.; CHALLACOMBE, S.J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**. 154:3266-3280. 2008.

NETEA, M.G., VAN DER GRAAF, C.A.A.; VONK, A.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Disease**. 185:1483–1489. 2002.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**. 75:749–755. 2004a.

NETEA, M.G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C.A.A.; VAN DER MEER, J.W.M.; VAN KRIEKEN, J.H.; HARTUNG, T.; ADEMA, G.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptor 2 inhibits cellular responses against *Candida albicans* through pathways mediated by IL-10 and regulatory T cells. **Journal of Immunology**. 172:3712–3718. 2004b.

NETEA, M.G.; GOW, N.A.R.; MUNRO, C.A.; BATES, S.; COLLINS, C.; FERWERDA, G.; HOBSON, R.P.; BERTRAM, G.; HUGHES, H.B.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; BUURMAN, E.T.; GIJZEN, K.; WILLIAMS, D.L.; TORENSMA, R.; MCKINNON, A.; MACCALLUM, D.M.; ODDS, F.C.; VAN DER MEER, J.W.M.; BROWN, A.J.P.; KULLBERG, B.J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **The Journal of Clinical Investigation**. 116(6). June 2006.

NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J.; GOW, N.A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**. 6:67–78. 2008a.

NETEA, M.G.; VAN DE VEERDONK, F.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 2008b.

ODDS, F.C. *Candida* species and virulence. **ASM News**. 60: 313–318. 1994.

PANAGIO, L.A.; FELIPE, I.; VIDOTTO, M.C.; GAZIRI, L.C. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. **J Medical Microbiology**. 51:929-936. 2002.

PEREIRA, F. E. L. Etiopatogênese Geral das Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.23-81.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology**. 20:133-63. 2007.

PHAN, Q.T.; MYERS, C.L.; FU, Y.; SHEPPARD, D.C.; YEAMAN, M.R.; WELCH, W.H.; IBRAHIM, A.S.; EDWARDS, J.E. JR.; FILLER, S.G. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biology**. Volume 5. 2007.

PIETRELLA, D., RACHINI, A., PANDEY, N., SCHILD, L., NETEA, M., BISTONI, F., HUBE, B.; VECCHIARELLI, A. The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. **Infection and Immunity**. 78:4754–4762. 2010.

PIETRELLA, D.; PANDEY, N.; GABRIELLI, E.; PERICOLINI, E.; PERITO, S.; KASPER, L.; BISTONI, F.; CASSONE, A.; HUBE, B.; VECCHIARELLI, A. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. **European Journal of Immunology**. 43:679–692. 2013.

RAMAGE, G.; COCO, B.; SHERRY, L.; BAGG, J.; LAPPIN, D.F. In vitro *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with in vivo denture stomatitis severity. **Mycopathologia**. 174: 11–9. 2012.

RANGANATH, R.M.; NAGASHREE, N.R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**. 202:159-242. 2001.

REALES-CALDERÓN, J.A.; SYLVESTER, M.; STRIJBIS, K.; JENSEN, O.N.; NOMBELA, C.; MOLERO, G.; GIL, C. *Candida albicans* induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. **Journal of Proteomics**. 2013.

REHAUME, L.M.; JOUAULT, T.; CHAMAILLARD, M. Lessons from the inflammasome: a molecular sentry linking *Candida* and Crohn's disease. **Trends in Immunology**. 31(5). 2010.

ROBINSON, M.J.; OSORIO, F.; ROSAS, M.; FREITAS, R.P.; SCHWEIGHOFFER, E.; GROSS, O.; SJEFVERBEEK, J.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G.D.; MOITA, L.F.; TAYLOR, P.R.; SOUSA, C.R. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. **Journal of Experimental Medicine**. 206: 2037-2051. 2009.

RODRIGUES, V.S.; VIDOTTO, M.C.; FELIPE, I.; SANTOS, D.S.; GAZIRI, L.C.J. Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. 179: 73–78. 1999.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **TRENDS in Microbiology**. 14(4). April, 2006.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-12 in infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. 10(4): 611–636. 1997.

ROILIDES, E.; SEIN, T.; SCHAUF ELE, R.; CHANOCK, S. J.; WALSH, T. J. Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**. 178(2): 589–592. 1998.

ROMANI, L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. **Journal of Leukocyte Biology**. Volume 68. August 2000.

ROMANI, L. In fungal pathogenesis. In: CALDERONE, R. A.; CIHLAR, L. R. (Ed.). **Principles and clinical applications**. New York: Dekker, Inc. 2002. p.401–432.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Immunology**. 6:338–343. 2003.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**. Volume 11. April 2011.

RUCHEL, R.; RITTER, B.; SCHAFFRINSKI, M. Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. **Zentralbl Bakteriol**. 273: 391–403. 1990.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**. 23: 2861–74. 2004.

SCHALLER, M.; JANUSCHKE, E.; SCHACKERT, C.; WOERLE, B.; KORTING, H.C. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. **Journal of Medical Microbiology**. 50: 743–747. 2001.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**. 48: 365–377. 2005.

SCHILD, L.; HEYKEN, A.; DE GROOT, P.W.; HILLER, E.; MOCK, M.; DE KOSTER, C.; HORN, U.; RUPP, S.; HUBE, B. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. **Eukaryotic Cell**. 10: 98–109. 2011.

SLEE, E.A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**. 276: 7320–6. 2001.

SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; TONNETTI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; TOGNELLINI, R.; REED, S.G.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F.

TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. **Journal of Immunology**. 155(3):1349-60. Aug 1995.

STEWART, K.; ABAD-ZAPATERO, C. *Candida* proteases and their inhibition: prospects for antifungal therapy. **Current Medicinal Chemistry**. 8: 941–8. 2001.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J.; The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. 12(7): 317-324. 2004.

SUTMULLER, R. P.; DEN BROK, M. H.; KRAMER, M.; BENNINK, E. J.; TOONEN, L. W.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**. 116(2): 485-494. 2006.

TADA, H.; NEMOTO, E.; SHIMAUCHI, H.; WATANABE, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; OHNO, N.; TAMURA, H.; SHIBATA, K.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; SUGAWARA, S.; TAKADA, H. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. **Microbiology and Immunology**. 46:503-512. 2002.

TAYLOR, B.N.; HANNEMANN, H.; SEHNAL, M.; BIESEMEIER, A.; SCHWEIZER, A.; ROLLINGHOFF, M.; SCHROPPEL, K. Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. **Infection and Immunity**. 73: 7061–7063. 2005.

TAYLOR, P.R.; TSONI, S.V.; WILLMENT, J.A.; DENNEHY, K.M.; ROSAS, M.; FINDON, H.; HAYNES, K.; STEELE, C.; BOTTO, M.; GORDON, S.; BROWN, G.D. Dectin-1 is required for  $\beta$ -glucan recognition and control of fungal infection. **Nature Immunology**. 8(1):31–38. January 2007.

TAKAHARA, K.; TOKIEDA, S.; NAGAOKA, K.; INABA, K. Efficient capture of *Candida albicans* and zymosan by SIGNR1 augments TLR2-dependent TNF-alpha production. **International Immunology**. 24: 89–96. 2012.

TOMALKA, J.; GANESAN, S.; AZODI, E.; PATEL, K.; MAJMUDAR, P.; HALL, B.A.; FITZGERALD, K.A.; HISE, A.G. A Novel Role for the NLRC4 Inflammasome in Mucosal Defenses against the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**. 7(12). Dec, 2011.

TORCHINSKY, M.B.; GARAUDE, J.; MARTIN, A.P.; BLANDER, J.M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. **Nature**. 458:78–82. 2009.

UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; MORISHIMA, H.; MATSUZAKI, M.; HAMADAL, M. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. **Journal of Antibiotics**. 23: 259–62. 1970.

URBAN, C.F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cellular Microbiology**. 8:668–676. 2006.

VAN DER GRAAF, C.A.; NETEA, M.G.; FRANKE, B.; GIRARDIN, S.E.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2) is not involved in the pattern recognition of *Candida albicans*. **Clinical Vaccine Immunology**. 13: 423–425. 2006.

VAN DE VEERDONK, F.L.; NETEA, M.G.; JANSEN, T.J.; JACOBS, L.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Redundant role of TLR9 for anti-*Candida* host defense. **Immunobiology**. 213: 613–620. 2008.

VAN DE VEERDONK, F.L.; JOOSTEN, L.A.; DEVESA, I.; MORA-MONTES, H.M.; KANNEGANTI, T.D.; DINARELLO, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; GOW, N.A.; KULLBERG, B.J.; NETEA, M.G. Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1beta production by the fungal pathogen *Candida albicans*. **Journal of Infectious Disease**. 199:1087–1096. 2009.

VECCHIARELLI, A.; PULITI, M.; TOROSANTUCCI, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F. In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. **Cell Immunology**. 134:65–76. 1991.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R.J.; ATKINS, C.J.; LOCKSLEY, R.M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**. 24: 179–189. 2006.

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

VONK, A.G.; NETEA, M.G.; VAN, KRIEKEN, J.H.; IWAKURA, Y.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Disease**. 193:1419–1426. 2006.

WHITE, T.C.; MIYASAKI, S.H.; AGABIAN, N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**. 175: 6126–6133. 1993.

WHITE, T.C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **Journal of Bacteriology**. 177:5215-5221. 1995.

WILLMENT, J.A.; BROWN, G.D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends in Microbiology**. 16: 27–32. 2008.

WITTE, E.; WITTE, K.; WARSZAWSKA, K.; SABAT, R.; WOLK, K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. **Cytokine Growth Factor Review**. 21: 365–379. 2010.

WU, H.; DOWNS, D.; GHOSH, K.; GHOSH, A.K.; STAIB, P.; MONOD, M.; TANG, J. *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4–6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. **The FASEB Journal**. 27. 2013.

YAMAMOTO, Y.; KLEIN, T.W.; FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. **Infection and Immunity**. 65:1077–1082. 1997.

YANG, X.O.; PANOPOULOS, A.D.; NURIEVA, R.; CHANG, S.H.; WANG, D.; WATOWICH, S.S.; DONG, C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. **Journal of Biological Chemistry**. 282: 9358–9363. 2007.

YANG, X.O.; PAPPU, B.P.; NURIEVA, R.; AKIMZHANOV, A.; KANG, H.S.; CHUNG, Y.; MA, L.; SHAH, B.; PANOPOULOS, A.D.; SCHLUNS, K.S.; WATOWICH, S.S.; TIAN, Q.; JETTEN, A.M.; DONG, C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . **Immunity**. 28: 29–39. 2008.

YUAN, X.; WILHELMUS, K.R. Toll-like receptors involved in the pathogenesis of experimental *Candida albicans* keratitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 51: 2094–2100. 2010.

ZAKIKHANY, K.; THEWES, S.; WILSON, D.; MARTIN, R.; ALBRECHT, A.; HUBE, B. From attachment to invasion: infection associated genes of *Candida albicans*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi Japanese Journal of Medical Mycology**. 49: 245-251. 2008.

ZELANTE, T.; FALLARINO, F.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. **Microbes and Infection**. 11: 133–141. 2009.

ZELANTE, T.; IANNITTI, R.; DE LUCA, A.; ROMANI, L. IL-22 in antifungal immunity. **European Journal of Immunology**. 41: 270–275. 2011.

ZELANTE, T.; IANNITTI, R.G.; DE LUCA, A.; ARROYO, J.; BLANCO, N.; SERVILLO, G.; SANGLARD, D.; REICHARD, U.; PALMER, G.E.; LATGÉ, J.P.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Sensing of mammalian IL-17A regulates fungal adaptation and virulence. **Nature Communications**. 3: 683. 2012.

ZENARO, E.; DONINI, M.; DUSI, S. Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. **Journal of Leukocyte Biology**. 86: 1393–1401. 2009.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A**

Normas para submissão de artigos no periódico *Microbes and Infection* (fator de impacto 2.815).

### **1 THE CONTENTS OF MICROBES AND INFECTION**

*Microbes and Infection* publishes 15 peer-reviewed issues per year in all fields of infection and immunity, covering the different levels of host-microbe interactions, and in particular

- the molecular and cell biology of interactions between hosts and microbes (viruses, bacteria, parasites and fungi)
- the local response of infected organisms, including pathogenesis
- animal models of infectious diseases
- vaccine development
- all aspects of the immune response to infection

Clinical and epidemiological studies and accounts of clinical trials may be included.

Submission of pure case reports and veterinary studies is discouraged

Special issues ("Forums") focus on the present knowledge of a virulent microbe and the disease it causes, or on critical issues relevant to the scope of the journal

### **2 TYPES OF PAPERS**

- original report
- review (commissioned)
- special issue (commissioned)
- short communication ; correspondence

### **3 HOW TO SUBMIT A MANUSCRIPT**

Please use our online e-submission site: <http://ees.elsevier.com/micinf>

Submission of revised manuscript: revision should be returned within two months.

Please Note: BEFORE submitting and/or resubmitting your paper, it is imperative to have the entire manuscript checked by an English mother-tongue scientist. The journal does not correct the English syntax.

## 4 FORMAT

General information:

Limit the abstract to 200 words or less; limit the text to 5 000 words or less. A maximum of 50 references is allowed; and a maximum of 6 figures and tables (total) is allowed. Papers not respecting these rules will not be sent to the reviewers.

Double-space throughout (including references, figure legends and table footnotes).

Use 2.5-cm (1 inch) margins on all four sides.

Use a font size of at least 12 points.

Number each page top right (title page is 1).

Number each chapter heading, starting with Introduction (see section 6.4. below)

Use either American or English spelling, but not both.

In general, do not use capital letters (except for first letter) for titles, authors names, section headings, etc.

When referring to figures in the main text, "figure" is abbreviated to Fig. (e.g., Fig. 1).

When referring to tables, use Arabic numerals (e.g., Table 2).

Differentiate between zero and the letter O, and between the number one and the letter "l".

## 5 CONVENTIONS

5.1. Microorganisms: Follow guidelines of the International Nomenclature Committee. Genus and species are written in full the first time the name appears in text; subsequently, only use the first letter of the genus, followed by the species (e.g., *Escherichia coli*, then *E. coli*). Note the space between the genus abbreviation and the species.

5.2. Units of measurement: Follow the Système International (SI). Always respect the space between the number and the unit (e.g., 100 °C, 25 mg). Do not use commas for decimals. Use small "l" for liter.

5.3. Use of italic/roman type: Genetic loci are italicized; protein products of the loci are not italicized. Latin words in current use, such as *in vitro/vivo/situ*, *via*, *et al.*, *a posteriori*, etc., are not italicized (note the use of abbreviative points for expressions such as *cf.*, *e.g.*, *i.e.*, *et al.*, etc., which appear in roman type).

5.4. When using Greek letters, use the "font" command and not "insert".

## 6 ORGANIZATION OF ORIGINAL REPORTS

### 6.1. Title page:

Title: avoid using uppercase letters other than the first word. Do not use nonstandard acronyms or abbreviations.

Authors' names: full first name followed by family name of each author. Superscript letters (a, b, etc.), not numbers, link the author's name to his/her affiliation. The name of the author responsible for correspondence and proof correction is indicated by an asterisk (\*) after the superscript letter. Use commas to separate names; do not use 'and' before the last author's name.

Affiliations: The complete address (department and/or laboratory, college, university, and full postal address) for each author, preceded by the superscript letter (a, b, etc.) should follow the list of names.

Each address is in a separate paragraph.

Up-to-date telephone and fax numbers, e-mail address, and present, complete postal address of the corresponding author appear separately on the title page.

### 6.2. Abstract and keywords:

Abstract: a maximum of 200 words, summarizing the objective, and major conclusions. Do not use references, footnotes or abbreviations in the abstract.

Keywords: below the abstract, provide a list of at least 3 keywords which exist in the MeSH® thesaurus. They are in uppercase letters, separated by semi-colons. They are used for indexing your paper and express the precise content.

### 6.3. Abbreviations:

Used as an aid to the reader (therefore, sparingly), for words used at least 3 times, they are defined in the text the first time they appear, followed by the abbreviation in parentheses. Use this abbreviation thereafter.

### 6.4. Main text of original reports:

Each chapter is numbered according to international standard (1. - 1.1. - 1.1.1., etc.). (See model below). For chapter headings, avoid using uppercase letters other than the first word, and do not use punctuation at the end.

The length of the main text should not exceed 5 000 words.

Model for numbering of chapters:

**1. Introduction****2. Materials and methods***2.1. Infection models**2.1.1. Mouse model*

Titles in Bold and subtitles in Italic

**1. Introduction:** it should not summarize the results.

**2. Materials and methods:** avoid the use of commercial names.

**3. Results:** present the observations, with minimal reference to earlier literature and to interpretations.

**4. Discussion:** Avoid repeating parts of the Results.

**Acknowledgments:** personal acknowledgments precede those of agencies and institutions.

**References**6.5. References:

References are limited to 50

In main text: Numbered references appear in the main text between square brackets ([1], [2, 3], [4–7], etc.), in the order of appearance in the text, from 1 to n.

In reference list: Numbering corresponds to the references in the text; the list is not in alphabetical order. Journal titles are abbreviated according to Index Medicus and Biosis. Only published work and manuscripts in press (indicate the journal which has accepted them) appear in the list. Manuscripts in the submitted stage, or in preparation, and personal communications are designated "unpublished" in the text but are not numbered and do not appear in the list at the end.

Please use the order/style given in the following examples, as well as the exact punctuation. Use square brackets for the numbering.

*Periodicals*

[1] D.B. Polk, R.M. Peek Jr., *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 403-414.

*Books*

An entire volume:

[2] C. Melchiorre, M. Giannella (Eds.), *Highlights in Receptor Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1984.

*A chapter in a book:*

[3] K. Takeda, S. Akira, Toll-like receptors: ligands and signalling, in S.H.E. Kaufmann, R.Medzhitov, S.Gordon (Eds.), *The innate immune response to infection*, ASM Press, Washington, DC, 2004, pp.257-270.

#### 6.6. Legends of figures:

Place all legends (including title for each) together on one page. Figures are consecutively numbered with Arabic numerals (Fig. 1, 2, etc.), according to the order of appearance in the main text.

#### 6.7. Figures:

A maximum of 6 figures and tables (total) is allowed.

Magnification is indicated by a scale bar.

In the text, indicate where figures should appear: these call-outs are written as "Fig.1, Fig.2", etc.

Help us reproduce your artwork with the highest possible standards — in both paper and digital format, by consulting: "How to prepare your graphics files" at the e-submission site for instructions, <http://ees.elsevier.com/micinf>

#### 6.8. Tables:

In the text, indicate where tables should appear: these call-outs for tables are written as "Table 1, Table 2, " etc.

Tables are consecutively numbered with Arabic numerals (Table 1, 2, etc.), according to the order of appearance in the main text. Each table carries a short title describing its contents in relation to the main text. Except for the heading and bottom of the table, avoid horizontal dividing lines; vertical lines are completely omitted from any table. Instead, the first column is left-aligned, and other columns are generally centered. (When making tables, use "insert" command and not "tabulation").

Only the first letter of each heading is capitalized, and any units appear in parentheses after or under the corresponding heading in roman characters.

Footnotes are collected under a table and referred to in the table by superscript letters (a, b, etc.). References in tables are numbered between square brackets, e.g.,

[5]

## **7 FORMAT OF REVIEWS**

Reviews do not exceed 7 000 words. References are limited to 70. Reviews begin with an abstract of about 50 words, stating the topic of the review or summarizing its

content. The main text may be divided into sections with subheadings, and it ends with a concluding section.

## **8 SHORT COMMUNICATIONS**

Follow the instructions for original reports. 100 words (abstract), 2 500 words (main text), 25 references maximum, 3 figures/tables total.

## **9 REPRINTS**

We provide 25 free reprints. To purchase additional reprints, fill in the order form which accompanies the proofs and return it to the publisher together with the corrected proofs.

## **10 COPYRIGHT**

Submission implies that the paper reports original research, has not been published previously, is not under consideration for publication elsewhere, and will not be published in whole or in part elsewhere (in the same or in any other language). As soon as the article is accepted, the author is considered to have transferred his or her rights to the publisher; submit a permission request using the online form at <http://www.elsevier.com/locate/permissionsJ>