

**PRODUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NET) Y SU
EFECTO FRENTE A *Paracoccidioides brasiliensis*.**



Susana Pamela Mejía de los Ríos. *Bióloga*.
Trabajo de investigación para optar por el título de
Magister en Microbiología y Bioanálisis.

Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
Enero 2014

**PRODUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NET) Y SU
EFECTO FRENTE A *Paracoccidioides brasiliensis*.**

**Susana Pamela Mejía de los Ríos. *Bióloga*.
Trabajo de investigación para optar por el título de
Magister en Microbiología y Bioanálisis.**

Tutor: Ángel González Marín, BSc., MSc., PhD.

**Comité Tutorial
Juan Álvaro López, MSc., PhD
Luz Elena Cano, PhD**

**Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
Enero 2014**

Nota de aprobación

El trabajo de grado titulado “**Producción de Trampas De Neutrófilos (Net) y su efecto frente a *Paracoccidioides brasiliensis***”, presentado por la estudiante SUSANA PAMELA MEJIA, para optar al título de Master en Microbiología y bioanálisis, fue revisado por el tutor y su comité tutorial y fue calificado como:

Aprobado

Ángel González Marín, BSc., MSc., PhD.

Tutor

Luz Elena Cano, PhD.

Miembro Comité tutorial

Juan Álvaro López, MSc., PhD.

Miembro Comité tutorial

A Dios; A Mariela y Edgar, mis padres quienes me brindaron su apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis A Juan; mi hermano por creer Siempre en mí y darme la fuerza para seguir adelante cuando más la necesite; A Lina y Luz, mis hermanas por sus consejos que me hicieron crecer como persona; a mi novio por su apoyo incondicional y su cariño me permitieron estar fuerte y feliz en el transcurso de mi trabajo; a mi tutor el Doctor Ángel González y a los miembros del comité tutorial la Doctora Luz Elena Cano y el Doctor Juan Álvaro López; que fueron mis profesores y guías, los cuales depositaron su confianza y sabiduría que permitieron culminar con éxito este proyecto

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8
1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCION.....	13
2.1. Definición de paracoccidiodomicosis y descripción del agente etiológico	13
2.2. Epidemiología de la paracoccidiodomicosis.....	16
2.3. Manifestaciones clínicas de la paracoccidiodomicosis.....	17
2.4. Características histopatológicas de la PCM.....	19
2.5. Interacción inicial entre <i>P. brasiliensis</i> y las células del hospedero.....	25
2.6. Respuesta de los PMN contra <i>P. brasiliensis</i>	32
2.7. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET).....	37
2.7.1. Netosis y estructura de las NET.....	37
2.7.2. Netosis e infecciones.....	43
2.7.3. Estrategias de evasión de NET por microorganismos patógenos.....	46
3. REFERENCIAS.....	49
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	60
5. HIPOTESIS.....	60
6. OBJETIVOS.....	61
6.1. Objetivo General.....	61
6.2. Objetivos Específicos.....	61
7. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN: Human neutrophil produce extracellular traps against <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	62
7.1. ABSTRACT.....	62
7.2. INTRODUCTION.....	63
7.3. MATERIALS AND METHODS.....	66
7.3.1. Strains and media.....	66
7.3.2. Reagents.....	67
7.3.3. PMNs isolation.....	68
7.3.4. NETs Visualization.....	68

7.3.5. Quantification of extracellular DNA.....	69
7.3.6. Killing assay	69
7.3.7. Statistical analysis.....	70
7.4. RESULTS.....	70
7.4.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> induce NETs formation.....	70
7.4.2. Quantification of NETs induced by <i>P. brasiliensis</i>	72
7.4.3. Formation of NETs by <i>P. brasiliensis</i> conidia is independent of ROS production, while yeasts morphotype partially depend of the NADPH activation.....	75
7.4.4. Diminished expression of an alternative oxidase (AOX) in <i>P. brasiliensis</i> is correlated with an increased induction of NETs	77
7.4.5. NETs do not exert a fungicidal mechanism against <i>P. brasiliensis</i>	78
7.5. DISCUSSION.....	79
7.6. ACKNOWLEDGEMENTS.....	84
7.7. CONFLICT OF INTEREST.....	84
7.8. REFERENCES.....	84
8. CONCLUSIONES.....	89
9. PERSPECTIVAS.....	89

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Paracoccidioidomicosis.....	13
FIGURA 2: Distribución epidemiológica de la paracoccidioidomicosis y distribución geográfica del género <i>Paracoccidioides</i>	14
FIGURA 3: Morfotipos de <i>P.brasiliensis</i>	15
FIGURA 4: Patrones histopatológicos en pulmón de ratón infectado con conidias de <i>P. brasiliensis</i>	22
FIGURA 5: Respuesta inmunológica frente a <i>P. brasiliensis</i>	24
FIGURA 6: Reconocimiento de <i>P. brasiliensis</i> por células del sistema inmune.....	29
FIGURA 7: Mecanismos de formación de NETs.....	42
FIGURA 8: NETs production by human neutrophils against conidia and yeast cells of <i>P. brasiliensis</i>	71
FIGURA 9: Quantification of NETs production by human PMNs against conidia and yeasts morphotypes of <i>P. brasiliensis</i>	73
FIGURE 10: Detection of extracellular DNA by Sytox green after treatment whit an inhibitor of with an inhibitor of NADPH oxidase activation.....	76
FIGURE 11: A <i>P. brasiliensis</i> mutant with diminished expression of an alternative oxidase (AOX) induced a higher NETs formation.....	77
FIGURE 12: Fungicidal activity of PMNs against <i>P. brasiliensis</i> yeasts.....	79

ABREVIATURAS

AOX: Alternative Oxidasa.

BHI: Brain Heart Infusion.

CARD: Caspase-associated recruitment domain.

CD: Dendritic Cell.

CFU: Colony forming Unit.

CGD: Cronic Granulomatous Disease.

CAT: Catalase.

COX2: Ciclooxygenasa.

CR: Complement Receptor.

CIB: Corporación para Investigaciones Biológicas.

DPI: Diphenyleneiodorium chloridae.

DTH: Delayed Test of Hypersensibility.

FMLP: N-formyl-Met-leu-Phe.

G-CFS: Granulocyte colony- stimulating factor.

GADPH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony- stimulating factor.

Gp43: Glicoproteína de 43 kDa.

H₂O₂: Hydrogen peroxide.

Ig: Immunoglobulin.

IL: Interlukin.

INF- γ : Interferon- γ .

L: Levadura.

LacCer: Lactosilceramida.

LPS: Lipopolysaccharides.

LTA: Lipoteicoic Acid.

M: Micelio.

MCP: Macrophage Chemoattractant Protein.

MEC: Extracellular Matrix.

MIG: Monokine induced by gamma interferon.

MIF: Macrophages migration inhibitory factor.

MIP: Macrophage Inflammatory Protein.

MR: Manosa Receptor.

MPO: Myeloperoxidase.

NE: Elastase.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NETs: Neutrophils Extracellular Traps.

NO: Nitric Oxide.

O₂: Superoxide Anion.

PAD4: Peptidilarginina deimiasa.

PCM: Paracoccidioidomycosis.

PDGF: Platelet derived growth factor.

PKC: Protein Kinase C.

PMA: Phorbol Merystate Acetate.

PMNs: Polymorphonuclear neutrophils.

PRR: Pattern recognition receptor.

RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted.

RFU: Relative Fluorescence Units.

RS: Receptor Scavenger.

ROS: Reactive oxygen species.

SMVM: Synthetic McVeigh Morton modified.

SOD: Superoxido dismutasa.

SyK: Protein tyrosine Kinase.

TLR: Toll like Receptor.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha.

TGF- β : Transforming growth factor beta.

1. RESUMEN

El hongo *Paracoccidioides brasiliensis* es el agente causal de la paracoccidioidomicosis (PCM), una micosis sistémica y endémica restringida a ciertas regiones de América Latina, incluyendo Colombia. En estudios experimentales se ha observado que los Polimorfonucleares neutrófilos (PMN) juegan un papel importante como células efectoras e inmunomoduladoras en los estadios tempranos de la infección por *P. brasiliensis*, contribuyendo a la resistencia del hospedero.

Recientemente se describió una nueva estrategia microbicida por los PMN: las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Estas consisten en la liberación de DNA nuclear con un alto contenido de histonas y proteasas, y están implicadas en la supervivencia o eliminación de diferentes microorganismos como los hongos *Aspergillus* spp. y *Candida albicans*.

En el presente estudio se demostró, mediante microscopía de fluorescencia, la producción de NETs frente a conidias y levaduras de *P. brasiliensis*. La producción de NETs se confirmó mediante la cuantificación de DNA por espectrofluorometría, donde se observó que las conidias y levaduras de *P. brasiliensis* presentaban niveles extracelulares de DNA equiparables a los PMN tratados con Lipopolisacárido (LPS) o infectados con levaduras de *C. albicans*. El tratamiento con DNasa mostró una disminución significativa de la fluorescencia, lo que comprobó que el DNA cuantificado era extracelular. Cuando se usó el inhibidor de la NADPH oxidasa [Difenileneiodonio (DPI)] se observó una inhibición parcial en la producción de NETs frente a las levaduras de *P. brasiliensis*; por el contrario, este inhibidor no afectó la producción de estas estructuras inducidas por las conidias del hongo, lo cual parece indicar que el mecanismo de producción de NETs frente a *P. brasiliensis* se presenta a través de mecanismos dependientes e independientes de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otro lado, cuando se trataron los PMN con citocalasina D o interferon gamma (IFN- γ) recombinante, no se observaron diferencias en la producción de NET frente al hongo, sugiriendo que la

fagocitosis o esta citoquina parecen no estar involucradas en este proceso. Adicionalmente, cuando se utilizó una cepa mutante de *P. brasiliensis* con una expresión disminuida del gen que codifica para una oxidasa alternativa [(AOX), enzima que participa en los procesos oxidativos], se observó que las levaduras de la cepa mutante indujeron un mayor nivel de NETs en comparación con la cepa silvestre o las levaduras que portaban el vector vacío. Finalmente, la cuantificación de Unidades formadoras de colonias (UFC) no mostraron diferencias significativas cuando los PMN fueron tratados con diferentes inhibidores de los procesos relacionados con la producción de NETs (DPI, DNasa o Citoclasina-D). Este es el primer estudio en el cual se demuestra que los diferentes morfotipos de *P. brasiliensis* (conidias y levaduras) inducen la formación de NETs; sin embargo, los resultados sugieren que este mecanismo de defensa parece ser inducido por mecanismos dependientes e independientes de ROS de acuerdo al morfotipo utilizado, de igual manera este mecanismo parece no ser efectivo en la eliminación del hongo, sin embargo podría ejercer un efecto fungiestático. Adicionalmente, la modulación de la producción de las NETs por *P. brasiliensis* podría estar relacionada con la virulencia del hongo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DEFINICIÓN DE LA PARACOCIDIOIDOMICOSIS Y DESCRIPCIÓN AGENTE ETIOLÓGICO

La paracoccidioidomicosis (PCM), es una micosis sistémica, granulomatosa que involucra primero el pulmón y luego se disemina a otros órganos y sistemas. (Figura 1) [1]. Es una micosis endémica restringida a ciertas regiones de América Latina; es causada por el hongo dimórfico *Paracoccidioides* spp. Actualmente, se han descrito dos especies pertenecientes a este género, *P. brasiliensis* y *P. lutzii* [1-3], siendo *P. brasiliensis* el agente causal más común de esta micosis. Este hongo presenta tres especies crípticas las cuales están distribuidas en diferentes zonas de Sur América: PS1 (presente en Brasil, Argentina, Paraguay, Perú, y Venezuela); PS2 (en Brasil y Venezuela); y PS3 (Restringida a Colombia); mientras que *P. lutzii* está restringida a ciertas zona de Brasil (Figura 2) [4, 5].

A



Restrepo A. Sin Publicar

B



Figura 1. Paracoccidioidomicosis. Rayos x de pulmón de un paciente con paracoccidioidomicosis (A).

Lesión en piel en un paciente con paracoccidioidomicosis diseminada (B).



Figura 2. Distribución epidemiológica de la paracoccidioidomicosis y distribución Geográfica del género *Paracoccidioides*.

P. brasiliensis es un hongo dimórfico térmico que tiene la capacidad de mudar de una fase micelial (M) saprófita, que se desarrolla a menos de 23°C, hacia una fase levaduriforme (L) que se da entre 36- 37°C (Figura 3). Esta transición dimórfica del hongo es un requisito para generar la enfermedad. La fase levaduriforme se observa en los tejidos del hospedero y en cultivo crece después de una a dos semanas de incubación a 36°C (28°C-37°C). Macroscópicamente, las colonias son blandas, cerebriformes y cremosas. Microscópicamente, las levaduras difieren en su tamaño (4-60 µm), presenta gemación múltiple y la forma típica es conocida como “timón de barco”, en donde hay una célula madre central rodeada por células hijas que brotan con variabilidad en el tamaño. La fase micelial del hongo es de

crecimiento lento, tarda entre 15-30 días para crecer en medios de cultivo microbiológicos. El micelio está formado por hifas hialinas septadas y delgadas, las cuales son las encargadas de producir las clamidoconidias; cuando son cultivadas en medios pobres o mínimos, el hongo produce propágulas conocidas como arthroaleuroconidias ($<5 \mu\text{m}$), consideradas las partículas infectantes [1, 6-8].

La pared celular es la principal estructura afectada por los cambios morfogénicos ligados al dimorfismo térmico del hongo. En ambas fases hay quitina, aunque en proporción tres veces mayor en la fase L. Por otro lado, los polímeros de glucosa están casi totalmente bajo la estructura de α -1,3-glucano en la fase L y como β -1,3-glucano en la fase M. El primero de estos polímeros juega un papel muy importante en la relación hospedero-parásito, por cuanto se encuentra en alta proporción ($>45\%$ del peso total de la pared celular) en las cepas virulentas y en menores cantidades en cepas con virulencia disminuida o avirulentas (hasta 3%). De allí que el α -1,3-glucán haya sido propuesto como un factor de virulencia [1, 9-11].

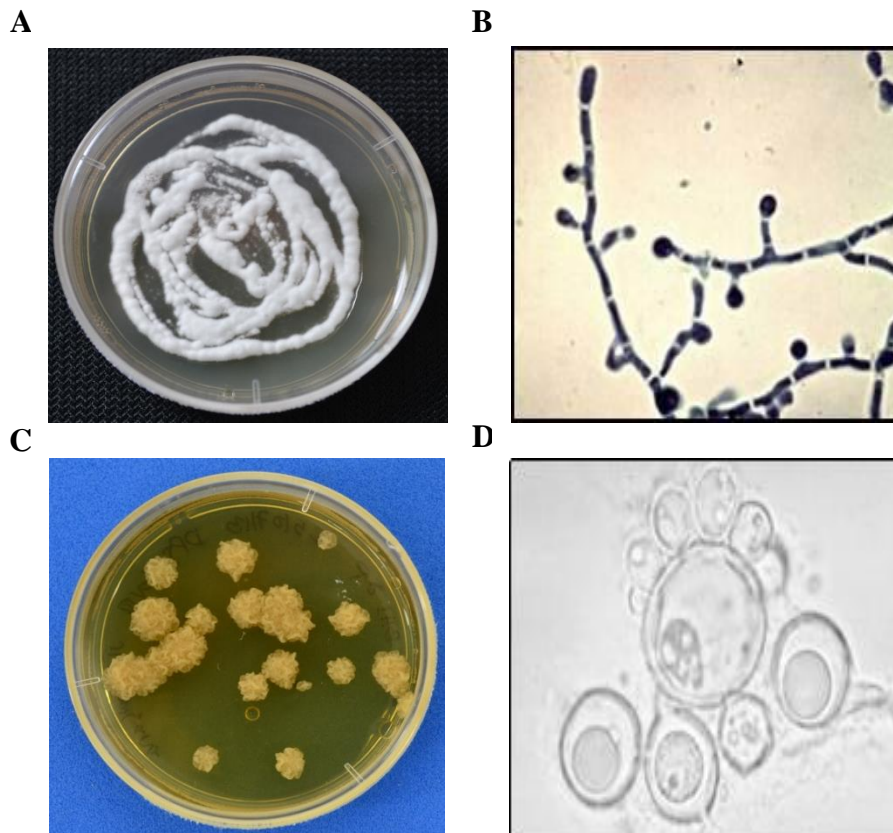


Figura 3. Morfotipos de *P. brasiliensis*. Fase Miceliar de *P. brasiliensis*, apariencia macroscópica (A) y microscópica (B). Fase Levaduriforme de *P. brasiliensis*, apariencia macroscópica (C) y microscópica (D).

2.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

La PCM es una de las infecciones fúngicas invasoras, la cual afecta principalmente individuos inmunocompetentes y en algunas ocasiones individuos inmunocomprometidos, incluyendo los tratados con corticoides, los trasplantados de órganos y los diagnosticados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) causada por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) e individuos con algunas inmunodeficiencias primarias [1, 12-15].

Esta micosis es más prevalente en Sur América especialmente en Brasil, Venezuela, Colombia y Argentina. En estos países, la enfermedad es endémica, pero los casos no se distribuyen de una forma homogénea alrededor del territorio y tienden a concentrarse en zonas rurales o sub-rurales aledañas a bosques húmedos tropicales o subtropicales [1, 2]. Pocos casos han sido reportados en praderas, zonas costeras, zonas desérticas y selvas ecuatoriales. Las condiciones que predominan en los países con alta endemia son temperaturas entre 17 y 24°C, altitudes entre 500 y 100 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación entre 900 y 1810 mm³/año, y una humedad relativa alta y constante (entre 6 y 70%) [1, 2]. Otra de las características de los lugares con alta prevalencia de la enfermedad es la presencia de bosques abundantes, gran cantidad de fuentes de agua, inviernos cortos y veranos lluviosos [1-3].

Epidemiológicamente, la edad, el género y la ocupación del hospedero son tres importantes factores de riesgo en la PCM. La enfermedad afecta principalmente a hombres en edades económicamente productivas (entre 30 y 60 años), y es más frecuente en hombres que trabajan en la agricultura,

particularmente en plantaciones de café, algodón y tabaco, aunque este escenario epidemiológico puede cambiar acorde a las nuevas prácticas de la agricultura [1-3].

Las tasas de incidencia y prevalencia de la PCM son difíciles de evaluar, debido a que esta micosis no es considerada una enfermedad de notificación obligatoria. En Brasil la tasa de incidencia anual es de 1-3 casos en 100.000 habitantes. En Colombia la tasa de incidencia es fluctuante entre 0,05 y 0,22 casos en 100.000 habitantes. Extrapolando estos datos en la población total de Latino América, se sugiere que 10 millones de personas han sido infectadas con este hongo, pero solo alrededor del 1-2% desarrollan la enfermedad [2, 3, 9, 16]. A pesar de que el contacto con el hongo es esencialmente el mismo para personas de cualquier sexo, la PCM es de 13 a 70 veces más frecuente en hombres que en mujeres [17]]. Las mujeres parecen estar protegidas contra la enfermedad, probablemente debido a que el 17- β -estradiol tiene la capacidad de inhibir la transición del hongo de su fase de micelio a levadura, además podría estar influyendo en la respuesta inmune de la mujer. En niños no hay diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad con respecto al género, y la enfermedad es poco común [1, 9, 17, 18].

2.3. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

La PCM puede presentarse en una forma asintomática (infección subclínica) o puede manifestarse en dos formas clínicas: como una infección aguda o subaguda (forma juvenil) o como una infección crónica (forma del adulto). En ambas, el curso de la enfermedad varía de paciente a paciente. La infección subclínica se presenta en individuos que viven en áreas endémicas y son personas que no manifiestan síntomas de la enfermedad, pero son positivos en las pruebas cutáneas utilizando paracoccidioidina [1, 9, 19, 20].

La PCM crónica o del adulto, representa el 90% de los casos y afecta principalmente a hombres adultos, donde la enfermedad progresa lentamente y la cual puede tardar hasta años para desarrollarse. En la PCM crónica se ven comprometidos en primera instancia los pulmones, alterando su funcionalidad. En muchos casos, la afección pulmonar puede ser silenciosa y el paciente solo consulta después que la enfermedad haya dado lugar a lesiones extrapulmonares (forma multifocal) donde se ven afectados otros órganos y tejidos, formando lesiones secundarias en las membranas de las mucosas, la piel, los nódulos linfáticos y las glándulas suprarrenales, entre otros [1, 9, 20-23]. Los síntomas respiratorios son inespecíficos y se caracterizan por tos, expectoración, dificultad para respirar, pérdida de peso, fiebre y anorexia. Las lesiones pulmonares se presentan como infiltrados variados de predominio bilateral, con fibrosis o cavidades y se localizan en la parte central e inferior de los pulmones [9].

En contraste, la PCM del tipo juvenil representa solo el 3-5% de los casos, compromete niños o adultos jóvenes, es más grave y se desarrolla en semanas o meses, dando lugar a una tasa alta de morbimortalidad, debido a que se presenta una hipertrofia de los órganos del sistema reticuloendotelial (bazo, hígado y ganglios linfáticos), lo que lleva a una obstrucción intestinal y/o abdominal [16, 22, 24]. Las biopsias de estos pacientes muestran a menudo una multiplicación activa del hongo sin que haya formación de granulomas en el sitio infectado. En esta forma clínica los pulmones no son el objetivo principal del hongo. Aun así, los cultivos microbiológicos de las secreciones pulmonares suelen ser positivos, lo que indica que este órgano también está involucrado. La radiografía simple de tórax muestra cambios variables, con hipertrofia de los ganglios linfáticos hiliares e infiltrados pulmonares [1, 9, 24].

Por otro lado, los patrones de la respuesta inmune también permiten diferenciar las manifestaciones clínicas en los pacientes con PCM. El control de la infección en individuos con la forma subclínica asintomática se debe a una respuesta celular robusta contra los antígenos de *P. brasiliensis*, mostrando

niveles altos de citoquinas tipo Th1 [interferón-gama (INF- γ), Interleuquina-2 (IL-2), y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)] y niveles basales de citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10). Las citoquinas producidas por las células tipo Th1 son responsables de activar una gran cantidad de macrófagos, una de las poblaciones celulares más importante en la resistencia ante la infección con *P. brasiliensis* [19, 25-29]. Adicionalmente, en la forma crónica se ha observado una respuesta inflamatoria con un predominio de células Th17, con participación de las células Th1 y Th22, y una respuesta variable de células tipo Th2. La respuesta Th17 contribuye a una resistencia parcial frente a la infección, pero puede inducir una respuesta inflamatoria exacerbada al estimular células epiteliales, y macrófagos para producir citoquinas y quimioquinas inflamatorias (CXCL8, IL-1 β , IL-23 e IL-6). Estas moléculas inducen la acumulación de PMN y otras células inflamatorias, lo cual conlleva a alteraciones en el tejido afectado y finalmente a la formación de la fibrosis [19].

La forma juvenil de la enfermedad se caracteriza por tener una baja respuesta de células tipo Th1 (principalmente IFN- γ y TNF- α), por el contrario presenta una alta actividad de células Th2/Th9 [IL-4, IL-5, factor transformante del crecimiento-beta (TGF- β), IL-10, IL-9, IL-21, inmunoglobulina-E (IgE) e IgG4], las cuales están relacionadas con la activación de la respuesta humoral y un aumento de eosinófilos en el foco de la infección [19, 25, 30].

2.4. CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS DE LA PCM

La forma crónica de la PCM progresa de forma lenta con pocos síntomas, y puede tardarse meses, incluso años para que se presenten las manifestaciones clínicas. Tuder *et al* (1985), describieron en 12 pacientes con PCM crónica las siguientes características: (a) reacción neumónica, (b) formación granulomatosa temprana, (c) granulomas compactos, (d) mezcla de patrones (granulomas incipientes y

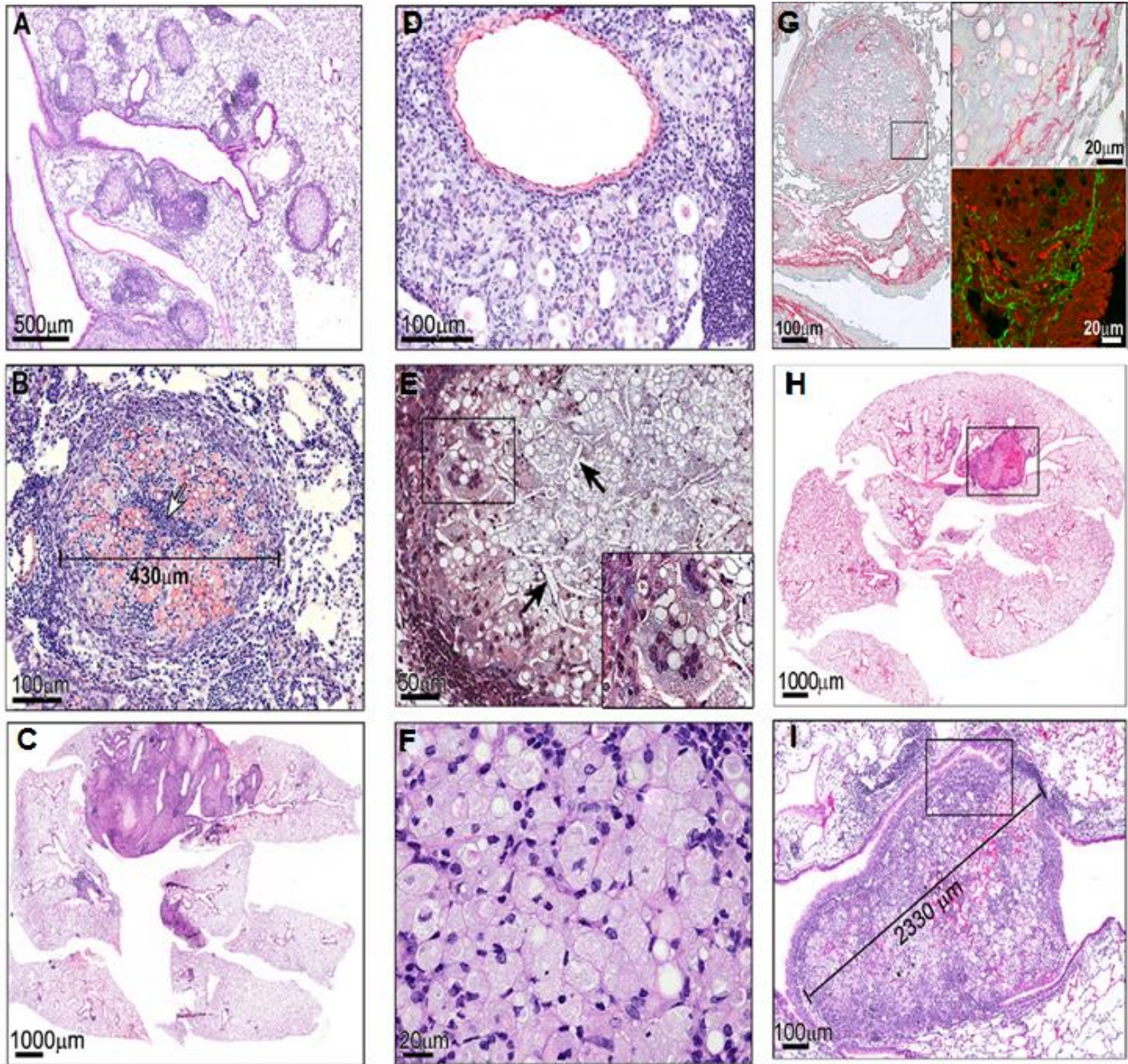
compactos en la misma área pulmonar), y (e) fibrosis pulmonar; este último patrón se presentó en todos los casos [31].

Las características histopatológicas tempranas de la PCM en humanos no son totalmente conocidas, puesto que es difícil realizar análisis histopatológicos secuenciales durante el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, se han desarrollado diferentes modelos experimentales en hámster, ratones, conejillos de indias, murciélagos y perros que han contribuido a determinar los diferentes estadios de la dinámica inflamatoria, el delineamiento celular y la composición de la matriz extracelular del granuloma [32-38] (Figura 4).

El grupo de investigación de Micología Médica y Experimental de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) ha realizado varios estudios experimentales en un modelo animal en ratón (múrido), en el que se simula lo que ocurre naturalmente en los humanos, al inocular intranasalmente los ratones con conidias de *P. brasiliensis*. En este modelo se observó que los ratones después de ser inoculados con las conidias, estas alcanzan las porciones distales de los pulmones donde se transforman en levaduras y se multiplican en el parénquima pulmonar. En este punto la participación de las proteínas de la matriz extracelular (como el fibrinógeno, la fibronectina, la laminina y el colágeno) son importantes en la adhesión del microorganismo al tejido pulmonar, para así poder establecer la infección y su subsecuente diseminación [33, 35, 39-41]. Durante las primeras 48 horas de la infección, se inicia un proceso inflamatorio agudo que involucra principalmente un infiltrado abundante de PMN y unos pocos macrófagos, los cuales se ubican alrededor de las propágulas del hongo. Este proceso a su vez se encuentra acompañado por una intensa explosión de citoquinas y quimioquinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL13, IL-17, Eotaxina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína quimioattractante de macrófagos (MCP1), proteína inflamatoria del macrófago (MIP1 α), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- γ y TNF- α . Después de las 48 post-infección los PMN comienzan a disminuir gradualmente. Por el contrario, en

ese mismo lapso de tiempo los macrófagos y los linfocitos comienzan a aumentar, alcanzando su valor máximo a las 96 horas, lo que a su vez se relaciona con la presencia de las diferentes citoquinas/quimioquinas antes mencionadas [34, 42]. Adicionalmente, en este corto periodo de tiempo se observan depósitos de proteínas de la matriz extracelular (MEC), específicamente fibrina, fibronectina, fibrinógeno y laminina. Este proceso continúa durante los siguientes periodos de inflamación donde se da un incremento de las proteínas de la MEC, a su vez asociado con el aumento en la migración de células pro-inflamatorias al sitio de la infección (pulmón) [33, 40]. En las siguientes cuatro semanas comienza la formación de granulomas con la presencia de células epitelioides, células gigantes, linfocitos, levaduras y unos cuantos PMN, algunos con aspecto apoptótico (Figura 4A-B). Además, en esta etapa se observa una reacción inflamatoria periarterial (Figura 4C-D) y una hipersecreción de citoquinas y quimioquinas (siguiendo el patrón de la primera etapa de la respuesta) [34]. En la semana 8 y 12 post-infección hay una reactivación del crecimiento fúngico, y un aumento de la respuesta inflamatoria y de la producción de colágeno del tipo I y III, particularmente en el espacio periarterial. El gran contenido de colágeno junto con la acumulación de proteínas de la MEC se asocian con el proceso fibrótico en el pulmón (Figura 4E) [34, 35, 43]. En estas etapas tardías se pueden encontrar algunas células xantomatosas y cristales de colesterol en la zona central del granuloma (Figura 4F-G). De igual modo, se observa una disminución de PMN y presencia en la periferia de un gran número de células plasmáticas maduras. Con respecto a las citoquinas y quimioquinas en estas fase se revela una disminución en los niveles de IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, IL13, e IL-15, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1 β y TNF- α . Finalmente, en la semana 16 post-infección la inflamación disminuye y se reguladas encuentran unas masas pseudotumorales (Figura 4H-I) acompañadas de una disminución en la producción de citoquinas y quimioquinas, excepto del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la citoquina inducida por IFN- γ (MIG o CXCL9), RANTES (CCL5) y la IL-12p40, que son

durante todos los periodos de la respuesta inflamatoria en la PCM experimental [33-35, 43, 44] (Figura 5).



Modificado de: Lopera. D., PLoS One. 2011

Figura 4. Patrones Histopatológicos en pulmón de ratón infectado con conidias de *P. brasiliensis*. (A) Múltiples Nódulos en una vista panorámica (3.5x), H&E. (B) Estructura típica de un granuloma con PMN entremezclados (flecha), Sirius rojo pH10.2, 10x. (C) Vista panorámica de una sección coronal

completa del pulmón (12 semanas post-infección) presentando una extensiva inflamación en el lado izquierdo del pulmón con múltiples lesiones periarteriales (0.4x), (H&E). (D) Inflamación de la vaina periarterial y presencia de varios hongos encerrados en un espacio perifúngico (40X), Sirius rojo pH 10.2. (E) Granuloma con apariencia ateromatosa mostrando múltiples cristales de colesterol (flechas) y células gigantes Touton (ver recuadro interno inferior izquierdo -100X-), Tinción con tricromico de Masson, 20X. (F) En la zona central del granuloma macrófagos xantomatosos con citoplasma foamy (63x), H&E. (G) Aspecto de la matriz extracelular de un nódulo. Presenta una pseudo-capsula delgada y concéntrica (10X), mejor ejemplificado en el recuadro interno superior (100X). En el recuadro interno inferior se muestra expresión de fibronectina En el recuadro inferior muestra expresión de fibronectina utilizando la técnica de inmunohistoquímica y anticuerpos específicos anti-fibronectina conjugados con fluorocromos (en verde fluorescente). (H) Vista panorámica de sección coronal del pulmón (16 semanas post-infección) con una masa pseudotumoral en el lado izquierdo del pulmón obstruyendo el lumen bronquial (0.4x), H&E. (I) Detalles de la masa pseudotumoral presentada en la figura H mostrando su gran dimensión (20X), sirius rojo pH 10.2.

En resumen, al inicio de la infección por *P. brasiliensis* se observa una respuesta inflamatoria aguda, la que posteriormente disminuye y se inicia la formación de granulomas. Durante este periodo también se observa una disminución en la carga fúngica, lo que sugiere la participación de una respuesta efectora efectiva. Sin embargo, con la progresión de la infección los granulomas se vuelven laxos y las levaduras entran en multiplicación activa. En este periodo, se ha observado una marcada inmunodepresión [25-27]. La respuesta inflamatoria en la PCM está acompañada de un proceso fibrótico asociado con una alteración en la producción y/o re-arreglo del colágeno y acumulación de proteínas de MEC. Finalmente, este conjunto de factores altera la funcionalidad del pulmón produciendo un proceso incapacitante en muchos de los pacientes [28,29].

Respuesta Inmunológica frente a *P. brasiliensis*

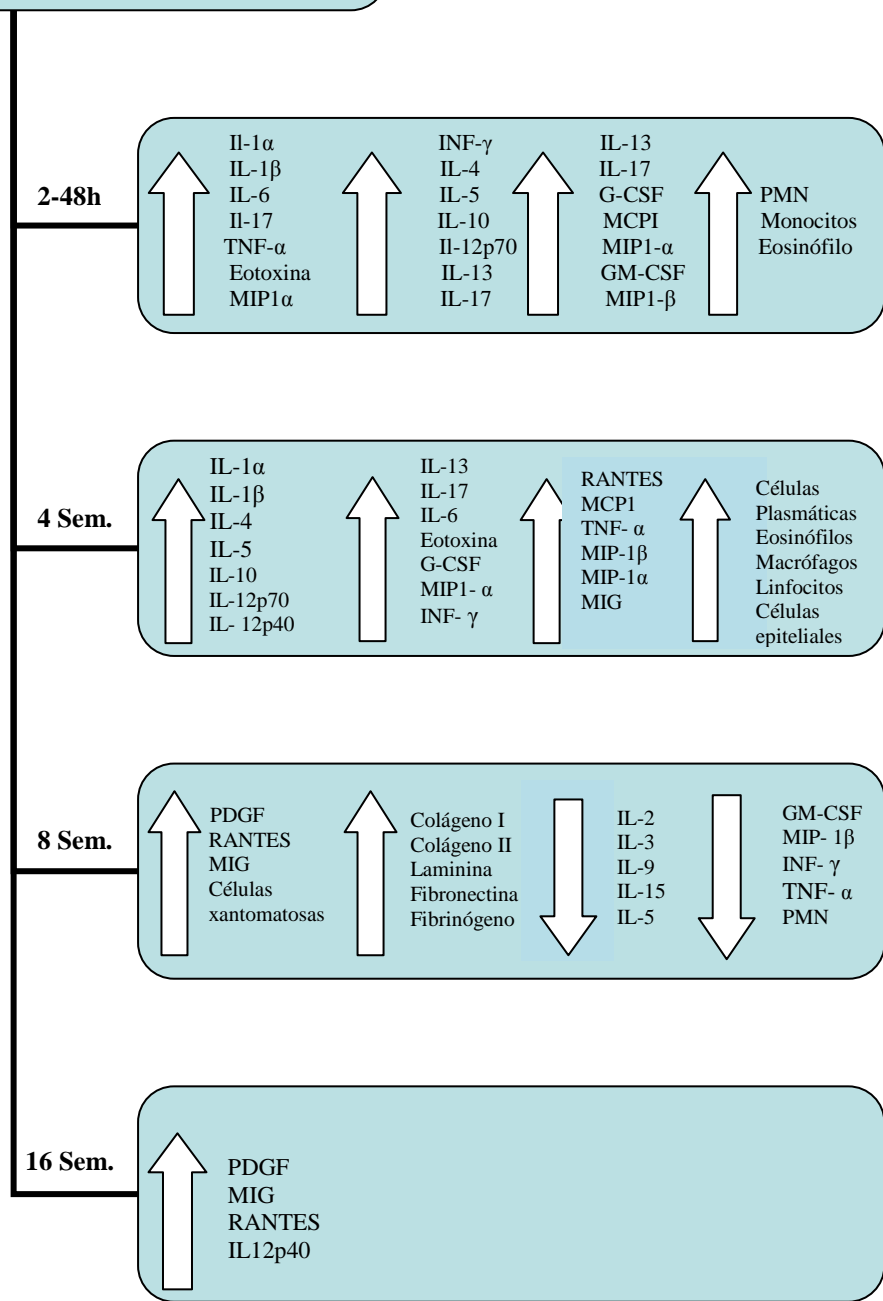


Figura 5: Respuesta inmunológica frente a *P. brasiliensis*. Estudios *in vivo* en ratón han permitido estudiar la respuesta inmunológica contra el hongo, la cual varía durante el desarrollo de la enfermedad, presentando una respuesta altamente inflamatoria en los estadios iniciales (2h, 48h), luego se observa un equilibrio entre la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria, y se inicia la formación de los granulomas (4 semanas). Finalmente, hay una disminución de la respuesta celular y algunas citoquinas, y un aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular con la subsecuente consolidación del granuloma (8 semanas y 16 semanas). PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) ; IL (Interleucina); MIP (Proteína inflamatoria de macrófagos); INF- γ (Interferon gamma); TNF (Factor de necrosis tumoral); PMN (Polimorfonucleares neutrófilos); GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos); G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos); MCP (Proteína quimioatrayente de macrófagos); MIG (Monoquina inducida por Interferon gamma) ; RANTES (Regulación de la activación de la expresión y secreción de linfocitos T normales).

2.5. INTERACCIÓN INICIAL ENTRE *P. brasiliensis* Y LAS CÉLULAS DEL HOSPEDERO

Como anteriormente se mencionó, durante las primeras etapas de la respuesta inmune se da la interacción del hongo con las células del hospedero. La adhesión de *P. brasiliensis* a las células epiteliales pulmonares, es uno de los eventos más importantes durante el proceso infeccioso. En esta interacción participan varias moléculas localizadas en la pared del hongo, entre las que se encuentra en mayor proporción el antígeno inmunogénico gp43, una de las más caracterizadas. Este antígeno es una glicoproteína de 43 kDa que contiene una cadena larga de oligosacáridos de manosa, con un residuo terminal de β -galactofuranosil. Después de ser producida, la glicoproteína es almacenada intracelularmente en vacuolas citoplasmáticas y lomasomas, para luego ser secretadas al exterior. Este

compuesto exocelular de la fase micelial y de la levadura se une a proteínas de la MEC como la laminina y la fibronectina. La interacción del hongo con el tejido facilita su penetración en el tejido gracias a la acción de sus proteasas que degradan las proteínas de la MEC. Adicionalmente, esta glicoproteína es reconocida por el receptor de manosa (MR) (Figura 6) presente en la superficie de las células inmunes tales como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, los cuales hacen su presentación a las células T, activándolas y estimulando la producción de citoquinas Th1 y Th2 [45-47]. Otros receptores involucrados en esta interacción son los receptores de patrones de reconocimiento (PRR), específicamente el receptor tipo *Toll* (TLR)-2 y el TLR-4, los cuales al igual que el MR, influyen en la producción de IL-10. Sin embargo, solo el MR y el TLR-4 parecen ser importantes en la producción de TNF- α después de la interacción con la proteína gp43. Adicionalmente, se ha descrito la capacidad que exhibe la gp43 para modular, en monocitos humanos, la expresión de TLR-2, TLR-4 y MR. En presencia de gp43 el porcentaje de monocitos MR positivos se incrementan entre las 4 y 18 horas de incubación, pero solo se presentó en el 2% de las células, por el contrario el TLR-2 y TLR-4 se expresan en el 90% de estas células [48]. No obstante, la gp43 parece tener un efecto inhibitorio en la fagocitosis por macrófagos y la producción de óxido nítrico (NO) [49] (Figura 6).

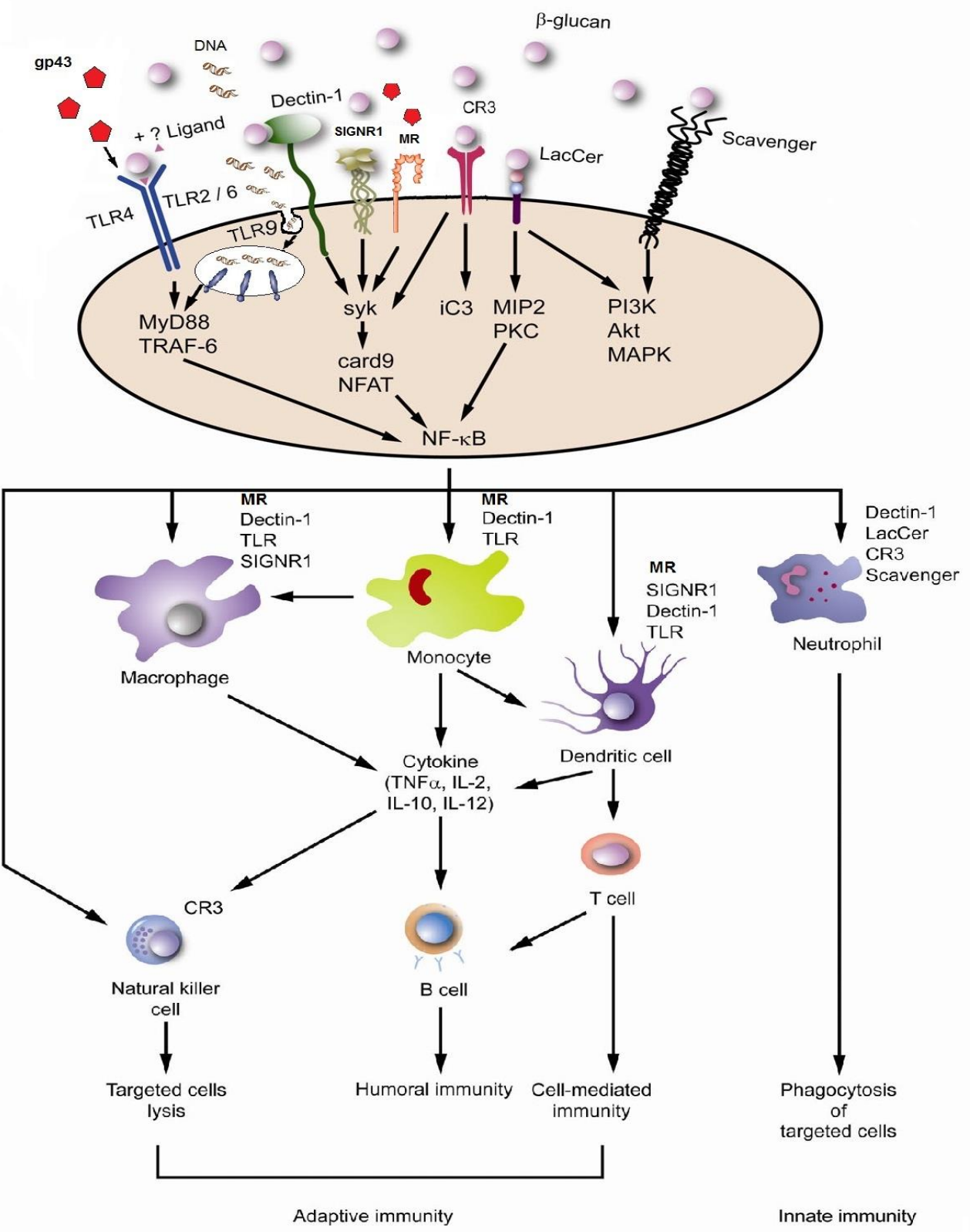
Adicionalmente, se ha evaluado la importancia de la activación de los TLRs frente a *P. brasiliensis*; así la activación del TLR-4 regula positivamente la producción de NO, IL-12, MCP-1 y TNF- α . Por el contrario, la ausencia del TLR-4 se asocia con una disminución en los niveles de NO y citoquinas pro-inflamatorias (IL-12 y GM-CSF). Paradójicamente se ha descrito que el TLR-2 parece tener un efecto perjudicial en la respuesta inmune frente a *P. brasiliensis*, como fue observado en ratones deficientes de esta molécula, en los que se presenta una disminución en la carga fúngica y su tasa de mortalidad es igual a la de los ratones silvestres. Por tanto, los resultados de estas investigaciones indican que ambos, el TLR-2 y el TLR-4 son utilizados por el hongo para infectar las células del hospedero y así garantizar su multiplicación intracelular. Los diferentes estudios sugieren que la ausencia de estos receptores se

asocia con infecciones menos graves, alteración en la migración de las diferentes poblaciones celulares y en la producción de ciertas citoquinas y quimioquinas. Adicionalmente se ha observado que el componente de los infiltrados celulares está compuesto principalmente por un mayor número de PMN y pocos macrófagos; de esta manera, los PMN a través de diferentes mecanismos efectores, podrían contribuir a la disminución de la carga fúngica [50]. Otro de los PRR que contribuyen al reconocimiento de las levaduras de *P. brasiliensis* o de su DNA es el TLR-9, el cual estimula la expresión y producción de citoquinas pro-inflamatorias. Se ha demostrado que ratones deficientes en TLR-9 presentan una tasa alta de mortalidad en las primeras 48 horas post-infección, daño en los tejidos e incremento en la expresión de las citoquinas tipo TNF- α e IL-6 y un aumento en el reclutamiento de PMN [51] (Figura 6).

La proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *P. brasiliensis* está también involucrada en la interacción con el hospedero. Esta se encuentra en el citoplasma y en la pared celular del hongo, interactúa con fibronectina, laminina y con colágeno tipo I [52]. Adicionalmente, González *et al.*, (2005), identificaron una proteína de 32 kDa en la pared celular de ambos morfotipos del hongo, la cual se une a varias proteínas de la matriz extracelular incluyendo laminina, fibronectina, y fibrinógeno; también demostraron que esta proteína está involucrada en la adherencia inicial de las conidias a las células epiteliales del pulmón que expresan en su superficie proteínas de matriz extracelular, por lo tanto, actúan como un puente entre los dos tipos de células [53]. Otros reportes acerca de esta proteína y utilizando metodologías de RNA antisentido indican que su disminución reduce la capacidad de unir proteínas de MEC y disminuye la capacidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedero mediante la modulación de la respuesta inmune inicial [54, 55].

Otro de los mecanismos moleculares de reconocimiento del hongo por las células del sistema inmune innato es mediante la opsonización de las levaduras y conidias con la fracción del complemento iC3b el cual interactúa con el receptor de complemento 3 (CR3; CD11b/CD18) y el receptor de manosa en los

macrófagos [56, 57]. También está el reconocimiento de los α -1,3-glucanes y β -1,3-glucanes de la pared a través del receptor Dectina-1 (o receptor de β -glucano, β GR), el CD11b/CD18, lactosilceramida (LacCer; CDw17) y los receptores “*scavenger*” (RS). Estos receptores se expresan en diferentes células del sistema inmune involucradas durante la interacción inicial con el hongo (macrófagos, PMN, células dendríticas y células NK) [58-63]. La activación de los PMN por el receptor LacCer se ha relacionado con la producción de la citoquina MIP-2, con la activación del factor de transcripción nuclear kapa B (NF κ B) y con el aumento de la explosión respiratoria [20]. Por otro lado, el reconocimiento por Dectina-1 en macrófagos estimula la expresión de ácido araquidónico, ciclooxigenasa 2 (COX2), IL-1 β e IL-23. La IL-1 β y la IL-23, inducen en los linfocitos T una respuesta tipo Th17, la cual produce IL-17 que a su vez estimula el reclutamiento de PMN [57].



Modificado de Chan. G .J. Hematol. Oncol. .2009

Figura 6. Reconocimiento de *P. brasiliensis* por células del sistema inmune: diferentes células del sistema inmune pueden reconocer las células de *P. brasiliensis* mediante diferentes receptores. Varias vías de señalización en los diferentes tipos celulares son activadas después del reconocimiento del hongo. MR (Receptor de manosa); gp (glicoproteína); TLR (Receptor de tipo Toll); CR (Receptor de complemento); IL (Interleucina); PKC (Proteína quinasa C); PI3K (Fosfoinositol-3-quinasa); TRAF (Factor asociado al receptor de TNF); MIP (Proteína Inflamatoria de macrófagos); LacCer (Lactosilceramida) ; CARD (Dominio de reclutamiento asociado a caspasas) ; Syk (Proteína tirosina quinasa) ; MIP (Proteína inflamatoria de macrófagos) ; NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas).

Adicionalmente, en macrófagos murinos (o de ratones) los receptores Dectina-1 y RS al reconocer levaduras de *Candida albicans* o moléculas de β -glucanes puros (zymozan) inducen la activación de la NADPH oxidasa y por lo tanto hay un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno [59, 64]. Estudios en *Histoplasma capsulatum* soportan la importancia de los glucanes en la interacción patógeno-hospedero. En el morfotipo de levadura de *H. capsulatum* al igual que *P. brasiliensis* se destaca por presentar en su pared celular un gran porcentaje de α -1,3-glucanes enmascarando los β -glucanes. Este enmascaramiento no permite que las células del sistema inmune reconozcan con facilidad los β -glucanes, y de esta manera desencadenar una respuesta adecuada contra estos patógenos. Hasta el momento no se conoce un receptor que reconozca α -1,3-glucanes, pero este puede actuar como un ligando señuelo en uno de los receptores de unión de β -glucanes, específicamente en Dectina-1, inhibiendo así la activación de la respuesta inmune. Sin embargo, este bloqueo puede subsanarse mediante el reconocimiento de los β -glucanes por otros receptores que reconocen también a esta glucoproteína. Adicionalmente, se ha observado que *H. capsulatum* en ausencia de α -1,3-glucanes produce una supresión en la producción de TNF- α en macrófagos; resultados similares se observan en

macrófagos con una expresión disminuida de Dectina-1, utilizando RNA de interferencia [65, 66] (Figura 5).

Entre las especies crípticas del género *Paracoccidioides* se han encontrado diferencias en su virulencia debido a variaciones en la expresión de ciertas proteínas. Recientemente se han realizado estudios de los perfiles proteómicos de diferentes aislamientos de *Paracoccidioides* tales como Pb01, Pb2 (PS2), Pb339 (S1) y PbEPM83 (PS3), hallando que algunas cepas (Pb01 y Pb2) presentaban una expresión disminuida de la proteína gp43. Además en Pb01, Pb2 y Pb339 se observó un incremento en la expresión de enzimas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo, las cuales podrían conferir un efecto protector al hongo frente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el hospedero. Estos estudios indican que los diferentes aislamientos de *Paracoccidioides* presentan grandes diferencias metabólicas [5, 67].

También se han estudiado diferencias a nivel patogénico e inmunogénico en ratones infectados con siete aislamientos de *P. brasiliensis* con diferentes grados de virulencia: avirulentas (Pb265 y IVIC Pb267), intermedias (Pb162, IVIC Pb 9 y PbSN), virulentas (Pb 2052) y altamente virulentas (Pb18). En estos estudios se observó que los diferentes aislamientos generaban por igual granulomas en los ratones, aunque la evolución inflamatoria y los daños en los órganos variaban de acuerdo al aislamiento utilizado. Además, los ratones infectados con los aislamientos intermedios y avirulentos indujeron una respuesta humoral disminuida, a diferencia de los aislamientos virulentos y altamente virulentos que indujeron un incremento en la respuesta humoral específica [68].

Mendes-Gianinni *et al.*, (2006) observaron una relación entre la virulencia y la adherencia a las proteínas de MEC. En este estudio, el aislamiento Pb18 (altamente virulento) presentó una alta capacidad de adherirse a proteínas de MEC principalmente a la laminina, seguido por el colágeno tipo I, la fibronectina y el colágeno tipo IV [45].

Algunos aislamientos de *P. brasiliensis* también pueden ejercer un estímulo sobre la expresión de ciertos receptores de las células del sistema inmune. En PMN y macrófagos de individuos sanos después de ser estimulados con una cepa avirulenta (Pb265) se observa una alta expresión de RNAm de TLR-2 y Dectina-1 y una producción significativa de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Adicionalmente, en las células infectadas con el aislamiento Pb265 se observó una producción balanceada de PGE₂, TNF- α e IL-10, contrario a lo observado en las células infectadas con el aislamiento virulento Pb18, quienes presentaron una mayor producción de TNF- α . Por lo tanto, el reconocimiento de Pb265 por TLR-2 y Dectina-1 resulta en una activación y producción adecuada de IL-10, la cual podría contrarrestar la excesiva respuesta inflamatoria mediada por el TNF- α y la PGE₂ [69].

2.6. RESPUESTA DE LOS PMN CONTRA *P. brasiliensis*

Las primeras células que entran en la microvasculatura para ingresar al foco de infección son los PMN. Estas células responden a una señal química generada en los tejidos inflamados y se activan quimiotácticamente para penetrar las paredes de los vasos e invadir el espacio extravascular. La función del PMN cuando llega al sitio de infección, es la destrucción del microorganismo mediante sus diferentes mecanismos de defensa (explosión respiratoria, degranulación y fagocitosis) [70].

Los PMN constituyen el 50-60% de los leucocitos en circulación. Después que estos salen de la médula ósea, circulan en la sangre de forma no activa, teniendo una vida promedio de aproximadamente 4-10 horas. En el sitio de infección o inflamación, los PMN se activan y se adhieren al endotelio de los vasos. La adhesión intravascular y la subsecuente extravasación comprende la coordinación de una serie de interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales reguladas por la activación de distintas moléculas de adhesión presentes en la superficie de ambas células [70].

En la PCM, los PMN cumplen un papel importante en la resistencia primaria contra la infección por *P. brasiliensis*. Una de las diferencias a destacar entre las lesiones crónicas de ratones resistentes a la infección por *P. brasiliensis* es la presencia de abundantes PMN en aéreas con gran cantidad de levaduras destruidas, lo contrario a los ratones susceptibles que presentan pocos PMN y un aumento en el número de estas estructuras fúngicas [71].

Las quimioquinas y los receptores de quimioquinas juegan un papel importante en la migración de los PMN al foco de infección por *P. brasiliensis*. Entre las quimioquinas asociadas con la migración de los PMN al foco inflamatorio se encuentran la KC y MIP-1 α (CCL3), las cuales se aumentan en la fase aguda de la infección estimulando la migración y activación de estas células, principalmente durante las primeras 48 horas post-infección; después de 3 días pos-infección ocurre un cambio en los perfiles de las quimioquinas (MCP-1, RANTES) que permiten la infiltración de leucocitos mononucleares (macrófagos y linfocitos). La producción de estas quimioquinas (MCP-1, RANTES) se correlacionan con la presencia de IFN- γ , sugiriendo que esta citoquina Th1 modula el reclutamiento de estas células inflamatorias en el pulmón [72].

La respuesta de los PMN en el foco de infección contra *P. brasiliensis* ha sido poco estudiada, por lo cual aún no son claros los mecanismos efectores. Hasta el momento se han dilucidado algunos de los mecanismos implementados contra *P. brasiliensis* y se ha observado que los PMN pueden ingerir la levadura del hongo a través de un proceso típico de fagocitosis con la formación de pseudópodos, los cuales interrumpen la conexión establecida entre la levadura madre y sus brotes. Los PMN también se asocian entre sí, formando una especie de vacuola extracelular sobre la levadura encapsulándola [73]. Estudios citoquímicos han demostrado que una vez *P. brasiliensis* se adhiere a la superficie de los PMN, provoca un estallido respiratorio con la liberación de ROS y posterior desgranulación [73]. Estudios en pacientes con PCM claramente muestran que la susceptibilidad de estos de contraer la

infección podría deberse a una deficiencia en la respuesta de estas células fagocíticas. Sin embargo, los PMN de estos pacientes son capaces de desencadenar una respuesta inmune frente al hongo mediante la fagocitosis y la activación de la explosión oxidativa, pero durante este proceso los PMN mueren, posiblemente a causa de la liberación de los productos oxidativos, de las enzimas contenidas en sus gránulos, y otros contenidos citoplasmáticos, o en su defecto por productos del hongo. Por lo tanto, se considera la posibilidad de una alteración funcional durante el proceso de fagocitosis causada por un factor todavía desconocido [74].

La incapacidad de los PMN para eliminar el hongo también se ha observado en modelos experimentales, así en ratones susceptibles y resistentes frente a la infección por *P. brasiliensis*, se observó que los PMN extraídos de ratones resistentes 15 días post-infección mostraron un incremento en la producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y de citoquinas tipo Th1, principalmente IFN- γ e IL-2; en contraste los ratones susceptibles presentaron una baja producción de H_2O_2 , TNF- α e IFN- γ y una alta producción de IL-5, IL-10 y TGF- β , mostrando una baja capacidad fungicida y progresión de la enfermedad [75]. Pina *et al.*, (2006), evaluaron la importancia de los PMN en ratones susceptibles (B10.A) y resistentes (A/J) a *P. brasiliensis*. Estos ratones fueron infectados con *P. brasiliensis* y depletados de los PMN utilizando un anticuerpo anti-Gr1. Luego de una semana post-infección las cargas fúngicas se incrementaron en ambos tipos de ratones, pero con el transcurso del tiempo en los pulmones de los ratones susceptibles se observó un incremento en el número de UFC, con una diseminación a hígado y bazo. Igualmente, en los pulmones de los animales susceptibles se observó un incremento en la producción de IL-12, IL-4, y citoquinas tipo Th1 y Th2, y además, se presentó una producción de anticuerpos específicos (IgG1, IgA, IgG3). Los ratones susceptibles antes y después del tratamiento con el anticuerpo anti-Gr1 fueron negativos para la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH). Por otro lado, los animales resistentes presentaron altos niveles de IL-12, IFN- γ y GM-CSF en pulmón, bajos niveles de enzimas hepáticas, presencia de anticuerpos específicos (IgG2a, IgG2b y

IgG3) y fueron positivos para la prueba DTH después de dos semanas de la depleción de PMN. Estos resultados sugieren que el papel de los PMN en la PCM depende, en parte, del patrón genético del hospedero [76].

Como se ha descrito previamente en este apartado, los PMN juegan un papel importante contra *P. brasiliensis*; sin embargo, son pocos los estudios acerca de su actividad fungicida frente a este hongo. Hasta el momento se ha evaluado el efecto activador o supresor de citoquinas sobre las funciones de estas células, y se ha observado que el IFN- γ , el GM-CSF, el TNF- α y la IL-15, estimulan su actividad fungicida [77-80]. El IFN- γ fue una de las primeras citoquinas evaluadas en PMN infectados con levaduras de *P. brasiliensis*, y se evidenció que las células al ser estimuladas con esta citoquina después de dos horas de incubación presentan un aumento en la actividad fungicida contra el hongo hasta en un 45%, este efecto se incrementó en los periodos de incubación alcanzando hasta un 72% a las 24 horas de co-cultivo. En periodos posteriores de incubación (48h y 72h) no se observó una disminución en la supervivencia, indicando un posible efecto fungistático [81]. La actividad antifúngica ejercida por el IFN- γ y el TNF- α se presentó en una forma dosis-dependiente, y se correlacionó con la activación de la producción de ROS. Estos resultados se confirmaron utilizando un inhibidor de la producción de ROS como la catalasa (CAT) que neutraliza el H₂O₂, y la superóxido dismutasa (SOD) que bloquea la producción del anión superóxido. La respuesta antifúngica de los PMN se afectó en presencia de estos inhibidores, sugiriendo que tanto el H₂O₂ como el anión superóxido (O₂⁻) actúan como moléculas efectoras contra *P. brasiliensis* [81-84].

Otra de las citoquinas que induce actividad fungicida en los PMN es la IL-15; esta citoquina exhibe un efecto dosis dependiente con incremento en la producción de H₂O₂. No obstante, parece que la producción de H₂O₂ no es la única molécula que actúa frente al hongo, dado que en presencia de CAT y de SDO, no se abolió completamente la eliminación del hongo, sugiriendo que la IL-15 podría inducir otros mecanismos no oxidativos involucrados en la respuesta de los PMN frente al hongo [85].

Los resultados de estos estudios concluyen que la activación de los PMN por ciertas citoquinas es esencial para la eliminación de *P. brasiliensis*, debido a la capacidad de los PMN de producir metabolitos del oxígeno [84, 85]. Este mecanismo de defensa frente al hongo podría explicar, en parte, la resistencia del hongo a la respuesta inmune, puesto que se ha descrito que el hongo produce catalasa que le confiere la capacidad de evadir los metabolitos oxidativos, sobreviviendo al ataque de estas células fagocíticas [86].

La fagocitosis es otro mecanismo importante de defensa ejercido principalmente por PMN, macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, ciertos microorganismos pueden evadir este mecanismo, sobreviviendo y manteniendo su capacidad de infección. Adicionalmente, algunos microorganismos patógenos, una vez fagocitados, tienen la capacidad de inhibir la apoptosis de las células fagocíticas, y de esta manera utilizar estas células como un vehículo para diseminarse a otros órganos o para replicarse dentro de ellas. La apoptosis aunque es un proceso celular intrínseco, es modulada por señales extracelulares. La apoptosis de los PMN puede ser modulada durante la respuesta inflamatoria por diversas moléculas, particularmente citoquinas como el GM-CSF, factores derivados de la activación del complemento como el C5a y productos bacterianos como el LPS, retardando la muerte de los PMN *in vitro* después de varias horas de incubación [87-89]. La modulación de este fenómeno se ha extendido a otras moléculas como los corticoesteroides, el G-CSF, el Factor Inhibidor de la migración de Macrófagos (MIF) y factores quimiotácticos como la IL-8 [90, 91]. Adicionalmente, la apoptosis puede ser inducida por otros mediadores como el TNF- α , la IL-10, ROS o la fagocitosis tanto de patógenos como de otras partículas opsonizadas. Entre los patógenos que inducen la apoptosis en PMN se encuentran *Escherichia coli* [92] y *Candida albicans* [93]. En contraste, patógenos intracelulares como *Chlamydia pneumoniae* [94], *Mycobacterium bovis* [95], *Mycobacterium tuberculosis* [96], *Histoplasma capsulatum* [97], *Leishmania major* [98], y *P. brasiliensis* [99], pueden inhibir este mecanismo. La inhibición de la apoptosis le provee al patógeno un nicho

intracelular que le permite sobrevivir dentro del hospedero y así mantener su capacidad infecciosa o la habilidad para diseminarse a otros órganos y tejidos [99].

En otros estudios se observó que *P. brasiliensis* tiene la capacidad de inhibir la apoptosis en PMN, y este mecanismo estaba asociado con un aumento en los niveles de la IL-8 en los sobrenadantes de los co-cultivos. El papel de la IL-8 en la inhibición de la apoptosis se comprobó cuando al neutralizar esta citoquina con un anticuerpo específico se restauraba la apoptosis de los PMN [99]. La IL-8 inhibe la apoptosis al suprimirse la interacción de Fas-FasL que es una señal proapoptótica [100].

Los estudios anteriores sugieren que los PMN juegan un papel importante como células efectoras e inmunomoduladoras en los estadios tempranos de la infección por *P. brasiliensis*, contribuyendo a la resistencia del hospedero o por el contrario exacerbando la respuesta inflamatoria, efecto que depende del patrón genético del hospedero. Sin embargo, es importante destacar que dichos trabajos se basan en las estrategias básicas antimicrobianas que incluyen la fagocitosis, degranulación y explosión respiratoria; sin embargo, estos mecanismos parecen no ser totalmente efectivos contra el hongo. Recientemente, fue descubierta una tercera estrategia de defensa de las células de la respuesta inmune que incluyen los PMN conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos (NET) que aún no ha sido explorada en la respuesta frente a *P. brasiliensis*, un nuevo mecanismo que podría estar implicado en los mecanismos de respuesta del hospedero contra el hongo.

2.7. TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTROFILOS (NET)

2.7.1. NETOSIS Y ESTRUCTURA DE LAS NET

Las Trampas extracelulares de Neutrófilos (NET) son formadas mediante un mecanismo que es denominado **NETosis** en el cual una vez la célula es activada, libera su contenido de DNA, histonas, proteasas y otras moléculas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos [101, 102]. Las NETs fueron descritas por primera vez por Volker Brinkmann en el 2004 quien demostró que estas redes estaban

constituidas por DNA nuclear y proteínas de los gránulos, además encontró que las redes se formaban ante la interacción con bacterias gran positivas y gran negativas, logrando no solamente atraparlas sino degradar sus factores de virulencia, lo cual permitía finalmente una rápida eliminación del microorganismo [101].

Las NETs son una forma de repuesta innata la cual hace parte de los primeros mecanismos de defensa del hospedero de una forma no específica e inmediata, esto quiere decir que las células reconocen y responden a patógenos de forma genérica y rápida. Las NETs atrapan a los microorganismos, previniendo que se propaguen. Estas trampas garantizan que los microorganismos entren en contacto con altas concentración de agentes antimicrobianos que degradan los factores de virulencia y finalmente eliminan el patógeno, por el sinergismo de todos sus componentes. Las fibras están compuestas en su mayoría por DNA descondensado, en el que se encuentran embebidas diferentes proteínas citoplasmáticas como histonas (H1, H2A, H2B, H3, y H4) y 30 diferentes proteínas de los gránulos [101].

Como se describió en un principio, muchas evidencias indican que las NET se forman en un contexto de muerte celular. La NETosis, a diferencia de la apoptosis y la necrosis celular, presenta una desintegración de la membrana nuclear y granular, pero la membrana plasmática se mantiene [103], lo que permite que la carga antimicrobiana de los gránulos se mezcle con la cromatina nuclear. En el proceso de formación de las NET, no hay signos morfológicos de apoptosis como vesiculación de la membrana, exposición de la fosfatidil-serina antes de la desintegración de la membrana plasmática o la ruptura nucleosomal del DNA [103]. También se ha observado que la actividad de las caspasas es solo detectada durante la apoptosis espontánea, pero no durante la inducción de Netosis estimulada por el PMA. Por otro lado, la muerte celular independiente de caspasas podría estar atribuida a la necrosis; sin embargo, la adición de necrostatin-1 no afecta la inducción de la NETosis. Este hallazgo indica que RIP1 que media la necrosis no regula la NETosis [104]. Recientemente, se describió una forma alterna

de formación de NET en donde la célula permanece viva al finalizar la respuesta. La viabilidad de la célula se mantiene gracias a que la construcción de las trampas no implica ningún daño de la membrana nuclear, y debido a que el transporte del DNA descondensado desde el núcleo hasta el medio extracelular es mediante vesículas. El DNA liberado en el medio extracelular se une a las proteínas de los gránulos que también han sido liberadas durante esta respuesta. Finalmente, la célula está desprovista de DNA en su núcleo, pero permanece viva y con la capacidad de realizar otras actividades como fagocitar; esta forma de producción de NET ocurre rápidamente (5-60 min), contrario a lo observado en las NET con muerte celular que puede tomar entre 120-140 min [102, 105].

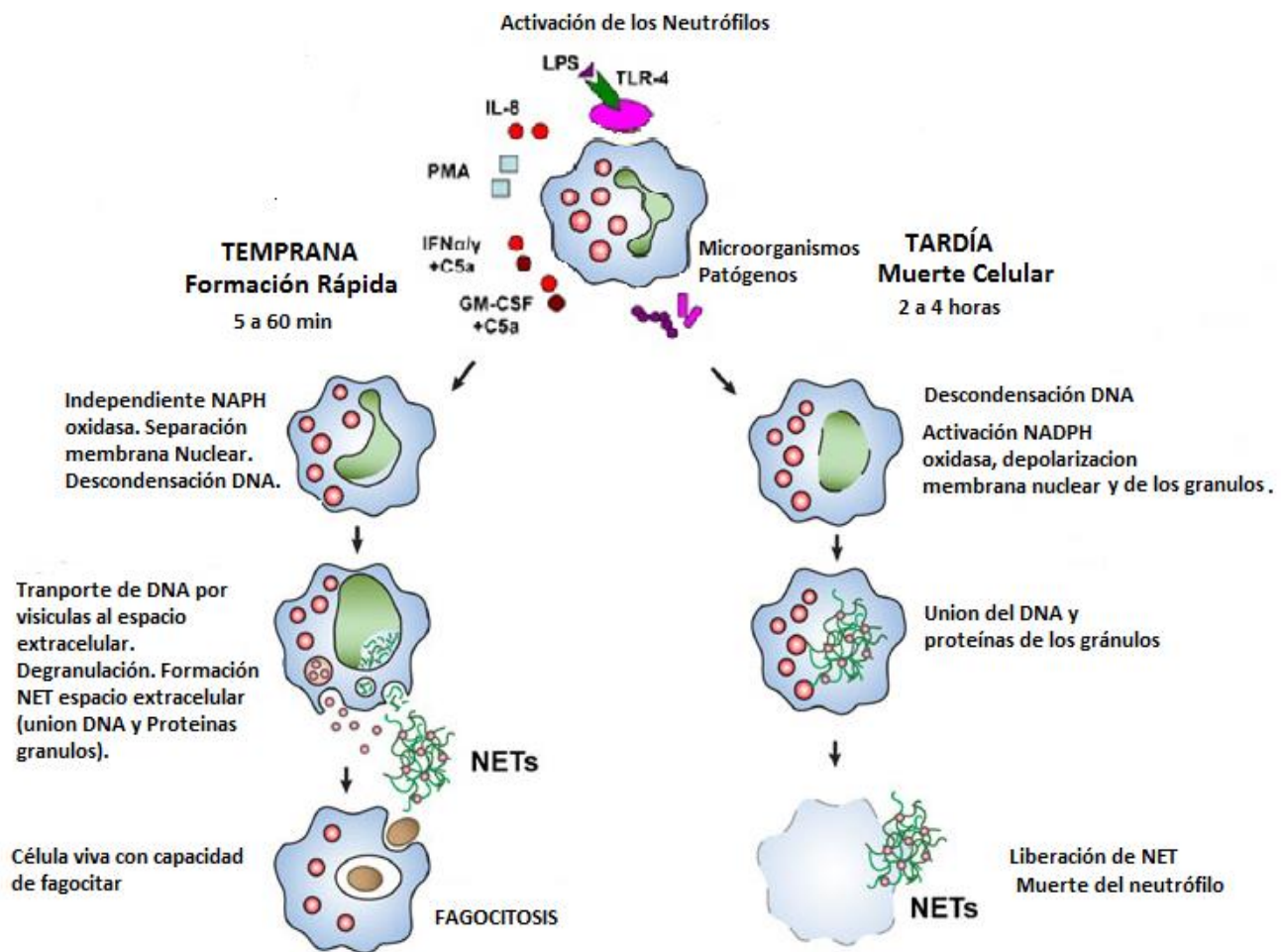
El proceso de formación de las NET vía muerte celular, puede ser inducido por acción de la IL-8, el PMA o el LPS, las plaquetas o por la interacción directa del PMN con diferentes microorganismos que incluyen bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Bacillus anthracis*; y hongos como *Candida albicans*, *Aspergillus* spp y *Cryptococcus gattii*; así como también el parásito *Leishmania amazonensis*, y el VIH [101, 103, 106-113]. También se ha establecido que hay un sinergismo cuando los PMN son pre-tratados con GM-CSF o IFN- γ/α . La producción de NET es dependiente de la producción de ROS mediante la activación de la NADPH oxidasa [101, 103]. La importancia de los ROS se demostró en PMN derivados de pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica (CGD) en donde se presentan defectos en los genes que codifican para las proteínas que forman el complejo NADPH oxidasa, inhibiéndose la generación de ROS. Estos pacientes tienen dificultad en eliminar los patógenos mediante la formación del fagolisosoma y la producción de NET [114]. Sin embargo, se ha observado la restauración a nivel genético del complejo de NADPH oxidasa con la recuperación de la habilidad para producir NET, habilitando a los PMN para eliminar hifas y conidias de *Aspergillus nidulans* [114, 115]. También se ha observado que PMN tratados con inhibidores de ROS como el DPI no pueden formar NET [109]. Adicionalmente, en neutrófilos tratados con PMA se ha evidenciado una activación de las proteínas

ERK y de la p38 MAPK dependiente de ROS, lo cual finalmente interviene en la liberación de trampas por los neutrófilos humanos [116, 117].

Después de la activación de la NADPH oxidasa ocurren cambios morfológicos en el núcleo de la célula, perdiendo su forma característica lobular, debido a que ocurre una descondensación de la cromatina. Este proceso se da en respuesta a los ROS, y se asocia con un escape de proteasas específicas de los gránulos azurófilos al citoplasma, las que posteriormente se desplazan hasta el núcleo induciendo la descondensación de la cromatina. Las proteínas involucradas en este proceso son la mieloperoxidasa (MPO) y la elastasa (NE). Primero la NE degrada la unión de la histona H4 a las otras histonas del núcleo, permitiendo la descondensación de la cromatina, proceso que se incrementa por la acción de la MPO, promoviendo la relajación de la cromatina independiente de su actividad enzimática [118, 119]. Adicionalmente, durante este proceso de descondensación, la H3 sufre un proceso de citrulinación por la enzima peptidilarginina deiminasa (PAD4) la cual cambia un aminoácido de arginina por una citrulina perdiendo así la carga positiva del aminoácido, y como consecuencia se modifican las interacciones con los residuos vecinos promoviendo la descondensación total del DNA [120]. Posteriormente, hay un rompimiento de la membrana nuclear que permite la liberación del DNA en el citoplasma donde se da la unión con las proteínas de los gránulos, los cuales habían sido liberados desde un inicio de este proceso. Finalmente, hay pérdida de la integridad de la membrana celular permitiendo la liberación de las NET al medio extracelular. La estructura de estas trampas está formada por fibras que tienen unos tramos lisos y otros globulares con diámetros de 15 a 17nm y de 25nm-50nm, respectivamente [101]. En este proceso se destaca que la actina y los microtubulos parecen cumplir un papel importante durante la formación de las NET. La actina puede estar relacionada con la transmisión de señales desde la superficie celular hasta el núcleo activando la citrulinación; su importancia se ha evaluado cuando las células se tratan con citocalasina D, las cuales presentan una notable disminución en la liberación de NET. Con respecto a lo microtubulos, estos están involucrados

con el transporte de las proteínas de los gránulos al núcleo para el proceso de descondensación de la cromatina, entre estas proteínas están la PAD-4, la MPO y la NE. Se ha propuesto que hay una interacción coordinada entre el citoesqueleto y los microtubulos importante en la dinámica temporal y espacial en la formación de las NET [121].

El segundo mecanismo de formación de las NET es poco conocido. Hasta el momento se ha asociado con estímulos específicos tales como la quimioquina MIP-2 (CXCL2), el LPS, bacterias como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes* y hongos como *Candida albicans* y productos de éstos como los β -glucanes. Además, se ha descrito la participación de receptores como el TLR-2 y CR3 (CD11b/CD18). Como se mencionò anteriormente, el primer mecanismo para la formación de NETs depende de la acción de ROS e implica finalmente la muerte celular. Por el contrario, se ha demostrado que en el segundo mecanismo, la activación de la vía de señalización de ERK/ MAPKinasa no se da por la acción de los ROS producidos por la NADPH oxidasa sino que se presenta de manera independiente. [102, 105, 122] (Figura 7).



Modificado de Branzk, N. Semin Immunopathol. 2013

Figura 7. Mecanismos de formación de las NETs. Se han descrito dos mecanismos de producción de NETs: i) uno de formación rápida (5-60 min) donde los neutrófilos mantienen su capacidad de fagocitar; y ii) de formación tardía (2 a 4 horas) donde las células finalmente mueren. LPS (Lipopolisacrido) ; PMA (forbol miristato acetato) ; IL (Interluquina) ; TLR (Receptor de tipo Toll) ; IFN (Interferon); GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos-Macrófagos) ; NADPH (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato).

El papel de los ROS en la NETosis se ha discutido en varios estudios antes de haberse descrito el segundo mecanismo de formación de las NET. Uno de los indicios que sugirió que los ROS no eran suficientes para activar la producción de las NET, se observó en PMN tratados con concentraciones

bajas de peróxido de hidrógeno, el cual solo indujo apoptosis y no NETosis [104]. Por otro lado, se ha observado que la estimulación con N-formyl-Met-Leu-Phe (FMLP), un potente inductor de NADPH oxidasa no induce NETosis [104]. Por el contrario, los estímulos pro-inflamatorios como el LPS y la IL-8 [101, 123] inducen NETosis, pero no desencadenan la actividad de NADPH oxidasa, solo sensibiliza las células para producir una explosión respiratoria. Por lo tanto, lo anterior podría explicar porque sólo en algunas investigaciones se describieron la formación de NET en respuesta a LPS e IL-8 [101, 123], mientras que otros observaron un retraso en la apoptosis de los PMN [101, 104, 123]. Otro mecanismo por el cual se induce la producción de NET independiente de ROS fue reportado utilizando PMN de pacientes con CGD, en los que al ser estimulados con un ligando del receptor de quimioquinas CXCR2 se induce la formación de estas estructuras [124].

Por último, una de las etapas dentro del proceso de la NETosis es la autofagia, la cual se ha visto que es esencial para que se induzca la formación de NET. Cuando se tratan las células con fármacos que inhiben la autofagia, se muestra una actividad normal de la explosión oxidativa por la NADPH oxidasa, pero se presenta una interferencia en la descondensación de la cromatina y consecuentemente de la NETosis, lo que finalmente resulta en una muerte celular mediada por apoptosis. Esto muestra que es posible que la acción de la NADPH oxidasa no es suficiente para la inhibición de las caspasas y que se necesita que se dé tanto la autofagia como la activación de la NADPH oxidasa. En estudios posteriores se observó que la autofagia era inhibida por antioxidantes, corroborando que los ROS producidos por la NADPH oxidasa contribuyen a la inducción de la autofagia [104, 125].

2.7.2. NETOSIS E INFECCIONES

El efecto microbicida de las NET se ha reportado en diferentes modelos animales y humanos con infecciones por hongos, parásitos, bacterias y virus. La acción antimicrobiana de las NET puede

comprender dos fases: *i*) atrapa e inmoviliza el patógeno para prevenir la propagación y/o diseminación a los tejidos, órganos y sistemas, y *ii*) el patógeno es eliminado por la acción microbicida de las proteínas presentes en las NETs [101].

Diferentes reportes han descrito como actúan las diferentes proteínas presentes en las NET contra ciertos microorganismos patógenos. Entre estas proteínas se destaca la elastasa la cual tiene la capacidad de degradar algunos factores de virulencia de las bacterias, como sucede en *S. flexneri*, donde se presenta una disminución de las proteínas de membrana IpaB e IcsA. Interesantemente, los factores de virulencia de las bacterias gram-positivas también son susceptibles a las proteasas de los PMN, por ejemplo en *S. aureus* la toxina α es muy baja cuando la bacteria está asociada a NET [101].

Una de las principales proteínas presentes en las NET son las histonas. Se ha observado que la histona H2A purificada elimina efectivamente bacterias gram-negativas, gram-positivas (*S. flexneri*, *Salmonella typhimurium* y *S. Aureus*) y promastigotes de *Leishmania amazonensis* [101, 111]. Específicamente, en los promastigotes de *L. amazonensis* se observó que cuando eran tratados con la histona H2A se eliminaban el 62% de estos parásitos. Adicionalmente, se observó que en presencia de PMN tratados con anticuerpos anti-histonas, solo el 42% de los parásitos de *L. amazonensis* tienen la capacidad de sobrevivir; adicionalmente, cuando los PMN fueron tratados con DNasa, los fragmentos que se generaron por la acción de esta enzima fueron efectivos en la eliminación de los promastigotes [111, 126].

Por otro lado, Urban *et al.*, (2009), realizaron un análisis cualitativo y cuantitativo de las proteínas que componen las NET. Estos investigadores, identificaron 24 proteínas diferentes entre las que se encuentran varias de las ya descritas (histonas, elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, etc). Entre las proteínas nuevas que se encontraron, se destaca el complejo denominado calprotectina (también

llamado complejo Mrp8714 o S100/A9), el cual ejerce una gran propiedad antimicrobiana, debido a que estas moléculas quelan los iones de Zn^{2+} , los cuales son requeridos para el ciclo de vida de algunos microorganismos. La función de esta proteína en la formación y/o actividad de las NET fue evaluada en ratones silvestres y deficientes de calprotectina. Estos ratones fueron infectados con *C. albicans*, y se evaluó la formación de NET y su efectividad en la eliminación del hongo; en este estudio se observó que en los ratones silvestres el hongo era eficientemente eliminado, a diferencia de los ratones deficientes de calprotectina que no resolvieron la infección y presentaron una alta tasa de mortalidad, indicando que la presencia de esta proteína le confiere un importante efecto antifúngico a las NET [127]. Las NET contra *C. albicans* juegan un papel muy importante contra la forma micelial del hongo, puesto que las hifas formadas en esta fase son muy grandes para ser fagocitadas por macrófagos o por los mismos PMN, por lo tanto, la producción de las NET es una estrategia efectiva para detener la expansión y/o propagación del hongo y para eliminar los diferentes morfotipos de este microorganismo. Recientemente se reportó que cuando los PMN interactúan con los β -glucanos de *C. albicans* mediante el CR3 (CD11/CD18), se observa una rápida agregación de los PMN y se activan la producción de NET sin perder la viabilidad de estas células fagocíticas. Adicionalmente, se determinó que durante el mecanismo de activación de NET frente a *C. albicans*, los PMN también interactúan con proteínas de MEC, específicamente con la fibronectina. Al parecer la interacción con los β -glucanos induce la producción de ROS y la fibronectina induce la formación de NET. De interés, en los PMN tratados al mismo tiempo con β -glucanos y fibronectina se inhibe la producción de ROS pero se activa la formación de NET. Adicionalmente, se determinó que la producción de las NET depende de la activación de las quinasas MAPK-ERK; como fuera confirmado al inhibir la fosforilación, en donde se observó la producción de ROS y la formación disminuida de estas estructuras [122].

En otro estudio, utilizando el modelo de infección con *A. fumigatus*, también se confirmó el papel de la calprotectina en la eliminación del hongo a través de la producción de NET; así, los ratones deficientes

de calprotectina fueron más susceptibles a desarrollar aspergilosis; adicionalmente, se observó que la calprotectina confiere un acción protectora de manera dosis-dependiente contra *A. nidulans* [115].

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria intracelular facultativa capaz de evadir la respuesta del sistema inmune del hospedero, logrando establecerse en este y permaneciendo latente por mucho tiempo. Aunque los macrófagos juegan un papel muy importante durante la infección por *M. tuberculosis*, también se ha destacado más recientemente un papel de los PMNs en el progreso de la infección, mediante la producción de ROS y la formación de NET. Sin embargo, las NET atrapan la bacteria pero no la eliminan, sugiriendo que el papel de las trampas frente a la bacteria es el de actuar como una barrera física [128, 129].

Hasta el momento, los PMN no son considerados como importantes células efectoras contra virus y pocos estudios han evaluado el papel de la producción de NET en respuesta a las infecciones virales. Recientemente, se ha reportado que el virus VIH-1 induce NETosis vía muerte celular, neutralizando la carga negativa de los viriones, disminuyendo así su capacidad infecciosa [113].

2.7.3. ESTRATEGIAS DE EVASIÓN DE NETs POR MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Los microbios emplean estrategias específicas para evadir las NET. El *Streptococcus* emplea al menos dos estrategias para evadir este mecanismo, y ambas estrategias están basadas en la modificación de la superficie de la bacteria. Una de las estrategias es reducir la afinidad de la superficie bacteriana para que no sean atrapadas por las NET. Wastha *et al.*, (2007) reportaron que cuando la bacteria *S. pneumoniae* está unida a las NET presenta una disminución en la expresión de los genes involucrados en la producción de los polisacáridos de la cápsula bacteriana y una disminución en la incorporación de

residuos de D-alanina del ácido lipoteicoico (LTA) el cual le introduce carga positiva a la cápsula de la bacteria [130].

Adicionalmente, se ha demostrado que las DNasas de *S. pneumoniae* y de *Streptococcus* del Grupo A (GAS) degradan las NET, promoviendo su virulencia. Beiter *et al.*, (2006) encontraron que en la pared del neumococo estaba presente una nucleasa (EndA) la cual le permite degradar las NET y así poder escapar de esta estructura [131]. En un modelo murino (o en ratón) infectado intranasalmente con esta bacteria, se demostró que el escape de neumococo de las NET promovió la propagación de este patógeno de las vías aéreas superiores de los pulmones al torrente sanguíneo [132]. Otros estudios demostraron que la expresión de DNasas es importante en la virulencia de GAS M1 (SPD, SPd3 y sda) y GAS M8 (sda1). Lo anterior se comprobó utilizando en un modelo murino de infección invasora con una cepa de GAS triple mutante para DNasas, la cual presentaba significativamente menos virulencia con respecto a la cepa silvestre; así cuando los ratones fueron infectados en la piel con la cepa triple mutante, estos animales resolvieron rápidamente la infección en comparación con los animales que se infectaron con la cepa silvestre sugiriendo que las DNasas producidas por esta bacteria podrían estar degradando las NET [133]. Estos mecanismos de degradación de NET han ayudado a explicar cómo estas estructuras podrían estar ejerciendo una presión genética sobre los factores de virulencia de GAS. Esta bacteria reside habitualmente como flora de la garganta. A nivel mundial existe un clon (MIT1) asociado con el síndrome de shock tóxico invasor y fascitis necrotizante. Dos factores de virulencia se han relacionado con el fenotipo invasor de MIT1, uno de ellos es el gen *sda1* que codifica para una DNasa que degrada NET y aumenta la supervivencia bacteriana; y la segunda es SpeB, una proteasa que fragmenta e inactiva la DNasa. GAS invasor presenta estos dos genes, y selecciona las mutaciones que regulan la expresión de SpeB, con el fin de evitar la degradación de la DNasa Sda1. El incremento de la actividad de la DNasa permite que GAS evada las NET [131, 132, 134].

Otro mecanismo utilizado por los patógenos es el empleo de catalasas, una enzima que degrada el H_2O_2 que es producido por el complejo NADPH oxidasa de los PMN, esencial en la formación de NET. Se ha reportado que tratamientos con catalasas recombinantes suprime la formación de NET *in-vitro* [103]; adicionalmente, se ha descrito una alta prevalencia de cepas virulentas de *S. aureus* que expresan catalasas que inhiben la oxidación intracelular y bloquean la producción de NET [96]. Sin embargo, es posible que los PMN produzcan NET de forma independiente de la producción de ROS frente de *S. aureus* y otras cepas catalasa positivas [102].

El hongo *A. fumigatus* presenta la capacidad de modular la producción de NET de acuerdo al morfotipo; esta capacidad se asocia con moléculas presentes en su superficie. Bruns *et al.*, (2010) reportaron que las conidias inducen la formación de NET en baja proporción en comparación con las hifas; este comportamiento está relacionado con la expresión de la hidrofobina RodA, una proteína presente en la superficie de las conidias. Estudios adicionales demostraron que conidias de *A. fumigatus* deficientes de RodA inducen NET en mayor proporción que las hifas tipo silvestre [109].

Finalmente, se ha reportado que el VIH es capaz de modular de manera indirecta la activación de los PMN. El virus ejerce este mecanismo al acoplarse al receptor DC-SIGN presente en las células dendríticas (DC) mediante la glicoproteína de la envoltura gp120; este acoplamiento activa la producción de IL-10 por las DC suprimiendo la formación de NETs [113].

Aunque un número creciente de estudios han investigado el papel de los PMN en la respuesta inmunitaria frente a *P. brasiliensis*, la influencia de las NET en la respuesta frente a este hongo hasta el momento no había sido estudiado. Por esta razón, el objetivo que nos planteamos en este estudio fue evaluar la capacidad de los PMN humanos para producir NET en respuesta a las conidias y levaduras de *P. brasiliensis*, y si este mecanismo existe, determinar su efecto sobre dichas estructuras fúngicas.

3. REFERENCIAS

- [1] Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:89-117.
- [2] Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol infect.* 2001;126:309-15.
- [3] Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011;49:785-98.
- [4] Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23:65-73.
- [5] Theodoro RC, Teixeira Mde M, Felipe MS, Paduan Kdos S, Ribolla PM, San-Blas G, Bagagli E. Genus paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects. *PloS One.* 2012;7:e37694.
- [6] San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002;40:225-42.
- [7] Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 1985;23:407-14.
- [8] Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol.* 1986;24(4):337-9. Epub 1986/08/01.
- [9] Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobon AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Seminars Resp Crit Care Med.* 2008;29:182-97.
- [10] Kanetsuna F, Carbonell LM. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of bacteriology.* 1970;101:675-80.
- [11] Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1972;110:208-18.
- [12] Nogueira LM, Santos M, Ferreira LC, Talhari C, Rodrigues RR, Talhari S. AIDS-associated paracoccidioidomycosis in a patient with a CD4+ T-cell count of 4 cells/mm³. *An Bras Derm.* 2011;86:S129-32.
- [13] Tobon AM, Orozco B, Estrada S, Jaramillo E, de Bedout C, Arango M, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis and AIDS: report of the first two Colombian cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998;40:377-81.

- [14] Rosenzweig SD, Holland SM. Recent insights into the pathobiology of innate immune deficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011;11(5):369-77.
- [15] Cabral-Marques O, Schimke LF, Pereira PV, Falcai A, de Oliveira JB, Hackett MJ, et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in Brazilian patients. *J Clin Immunol.* 2012;32(2):212-20.
- [16] Marques SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment updating. *An Bras Derm.* 2013;88:700-11.
- [17] Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:296-313.
- [18] Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984;46:346-53.
- [19] de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013;67:470-85.
- [20] Cano LE, Gonzalez A, Lopera D, Naranjo TW, Restrepo A. Pulmonary Paracoccidioidomycosis: Clinical, Immunological and Histopathological Aspects. In: Irusen ME, editor. *Lung Diseases*. Croatia: INTECH; 2012. p. 359-92.
- [21] Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 2002;10:80-7.
- [22] Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987;20:129-32.
- [23] Wanke B, Aide MA. Chapter 6--paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneum.* 2009;35:1245-9.
- [24] Londero AT, Melo IS. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia.* 1983;82:49-55.
- [25] Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microb Infect / Institut Pasteur.* 2002;4:139-44.
- [26] Marques Mello L, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Jr. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Hum Immunol.* 2002;63:149-54.
- [27] Fornazim MC, Balthazar A, Quagliato R, Jr., Mamoni RL, Garcia C, Blotta MH. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Europ Respirat J.* 2003;22:895-9.

- [28] Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microb Infect / Institut Pasteur*. 2003;5:413-8.
- [29] Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001;13:248-52.
- [30] Baida H, Biselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microb Infect / Institut Pasteur*. 1999;1:273-8.
- [31] Tuder RM, el Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1985;92:179-88.
- [32] Tani EM, Franco M, Peracoli MT, Montenegro MR. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with the immune response. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:291-300.
- [33] Gonzalez A, Restrepo A, Cano LE. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Mycopathologia*. 2008;165:313-30.
- [34] Lopera D, Naranjo TW, Cruz OG, Restrepo A, Cano LE, Lenzi HL. Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1232.
- [35] Cock AM, Cano LE, Velez D, Aristizabal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:59-66.
- [36] Lacaz Cda S, Vidal MS, Heins-Vaccari EM, de Melo NT, Del Negro GM, Arriagada GL, Freitas Rdos S. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of two strains. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999;41:79-86.
- [37] Greer DL, McMurray DN. Pathogenesis and immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in the fructivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia*. 1981;19:165-78.
- [38] Eisele RC, Juliani LC, Belitardo DR, Itano EN, Estevao D, Bracarense AP, Camargo ZP, Ono MA. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2004;42:549-53.
- [39] Franco L, Najvar L, Gomez BL, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:424-30.

- [40] Gonzalez A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Restrepo A, Cano LE. Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int J Exp Pathol*. 2008;89:106-16.
- [41] McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:165-75.
- [42] Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol*. 2003;41:391-9.
- [43] Restrepo S, Tobon A, Trujillo J, Restrepo A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J Med Vet Mycol*. 1992;30:173-84.
- [44] Alves CC, Azevedo AL, Rodrigues MF, Machado RP, Souza MA, Machado MA, Teixeira HC, Ferreira AP. Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice. *Comp Immun Microbiol Infectious Dis*. 2009;32:513-25.
- [45] Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Oliveira RZ, Matos Guedes HL, Soares, CP. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microb Infect / Institut Pasteur*. 2006;8:1550-9.
- [46] Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun*. 1994;62:1465-9.
- [47] Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesi JL, de-Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27:2309-13.
- [48] Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peracoli MT. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med Mycol*. 2011;49:694-703.
- [49] Flavia Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immun*. 2002;218(1-2):87-94.
- [50] Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2008;53:1-7.
- [51] Menino JF, Saraiva M, Gomes-Alves AG, Lobo-Silva D, Sturme M, Gomes-Rezende J, Saraiva AL, Goldman GH, Cunha C, Carvalho A, Romani L, Pedrosa J, Castro AG, Rodrigues F. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2317.
- [52] Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis*

is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 2006;74:382-9.

[53] Gonzalez A, Caro E, Munoz C, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE. *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. *Microb Path.* 2008;44:389-401.

[54] Hernandez O, Almeida AJ, Gonzalez A, Garcia AM, Tamayo D, Cano LE, Restrepo A, McEwen JG. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. *Infect Immun.* 2010;78:5280-6.

[55] Gonzalez A, Gomez BL, Diez S, Hernandez O, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun.* 2005;73:2486-95.

[56] Czop JK, Austen KF. A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J Immunol.* 1985;134:2588-93.

[57] Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Agarwal S, Ram S, Rice PA, Specht CA, Levitz SM. Relative contributions of dectin-1 and complement to immune responses to particulate beta-glucans. *J Immunol.* 2012;189:312-7.

[58] Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. *J Leuk Biol.* 2002;72:140-6.

[59] Jozefowski S, Yang Z, Marcinkiewicz J, Kobzik L. Scavenger receptors and beta-glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. *Inflamm Res.* 2012;61:113-26.

[60] Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:22014-20.

[61] Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol.* 1996;156:1235-46.

[62] Batbayar S, Lee DH, Kim HW. Immunomodulation of Fungal beta-Glucan in Host Defense Signaling by Dectin-1. *Biomol Therap.* 2012;20:433-45.

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

- [64] ElSORI DH, Yakubenko VP, Roome T, Thiagarajan PS, Bhattacharjee A, Yadav SP, Cathcart MK. Protein kinase Cdelta is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes. *J Leuk Biol.* 2011;90:599-611.
- [65] Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2007;104:1366-70.
- [66] Gorocica PT, M.L.; Vásquez, N. A.; Torres, P.A.; Lacurain, R.; Zenteno, E. The interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:492-6.
- [67] Pigosso LL, Parente AF, Coelho AS, Silva LP, Borges CL, Bailao AM, Soares CM. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fung Genet Biol.* 2013;60:87-100.
- [68] Singer LM, Burger, E., Franco, M.F., Moscar, M., Mendes, M.J.S., Calich, V.L.G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol.* 1989;27(2):71-82.
- [69] Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009;47:722-33.
- [70] Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-101.
- [71] Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VL, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J Leuk Biol.* 1996;59:526-33.
- [72] Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, Travassos LR, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Path.* 2003;163:583-90.
- [73] Dias MF, Filgueira AL, de Souza W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. *Microsc Microanal.* 2004;10:215-23.
- [74] Dias MF, Mesquita J, Filgueira AL, De Souza W. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. *Med Mycol.* 2008;46:241-9.
- [75] Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:615-23.
- [76] Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leuk Biol.* 2006;79:1202-13.
- [77] Diamond RD, Lyman CA, Wysong DR. Disparate effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. *J Clin Invest.* 1991;87:711-20.

- [78] Stevenhagen A, van Furth R. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. Clin Exper Immun. 1993;91:170-5.
- [79] Gaviria JM, van Burik JA, Dale DC, Root RK, Liles WC. Comparison of interferon-gamma, granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for priming leukocyte-mediated hyphal damage of opportunistic fungal pathogens. J Infect Dis. 1999;179:1038-41.
- [80] Gil-Lamaignere C, Winn RM, Simitsopoulou M, Maloukou A, Walsh TJ, Roilides E. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium* spp.: comparison with *Aspergillus* spp. Med Mycol. 2005;43:253-60.
- [81] Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 1999;37:261-7.
- [82] Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000;38:177-82.
- [83] Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 1999;37:19-24.
- [84] Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol. 2007;45:27-33.
- [85] Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peracoli MT, Soares AM. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. Cytokine. 2008;41:48-53.
- [86] Campos EG, Jesuino RS, Dantas Ada S, Brigido Mde M, Felipe MS. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Genet Mol Res. 2005;4:409-29.
- [87] Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. Blood. 1992;80:2012-20.
- [88] Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. Kidney Int. 1998;53:84-91.
- [89] Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. J Leuk Biol. 2005;78:1408-18.
- [90] Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Brit Med Bulletin. 1997;53:491-508.

- [91] Monack D, Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy. *Int J Med Microbiol.* 2000;290:7-13.
- [92] Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol.* 1996;156:3986-92.
- [93] Rotstein D, Parodo J, Taneja R, Marshall JC. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock.* 2000;14:278-83.
- [94] van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A, Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Masss M, Solbach W, Laskay T. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol.* 2004;172:1768-76.
- [95] Suttman H, Lehan N, Bohle A, Brandau S. Stimulation of neutrophil granulocytes with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. *Infect Immun.* 2003;71:4647-56.
- [96] Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000;164:2016-20.
- [97] Medeiros AI, Bonato VL, Malheiro A, Dias AR, Silva CL, Faccioli LH. *Histoplasma capsulatum* inhibits apoptosis and Mac-1 expression in leucocytes. *Scand J Immun.* 2002;56:392-8.
- [98] Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002;169:898-905.
- [99] Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peracoli MT, Soares AM. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. *Scand J Immun.* 2009;69:73-9.
- [100] Leuenroth S, Lee C, Grutkoski P, Keeping H, Simms HH. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions. *Surgery.* 1998;124:409-17.
- [101] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303:1532-5.
- [102] Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185:7413-25.
- [103] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176:231-41.

- [104] Remijnsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Deforge M, Williams J, Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011;21:290-304.
- [105] Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18:1386-93.
- [106] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13:463-9.
- [107] von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood.* 2008;111:3070-80.
- [108] Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microb.* 2006;8:668-76.
- [109] Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaniananda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latgé JP, Brakhage AA, Gunzer M. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Path.* 2010;6:e1000873.
- [110] Springer DJ, Ren P, Raina R, Dong Y, Behr MJ, McEwen BF, Bowser SS, Samsonoff WA, Chaturvedi S, Chaturvedi V. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PloS One.* 2010;5:e10978.
- [111] Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2009;106:6748-53.
- [112] Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, McFadden G, Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell host & microbe.* 2013;13(2):169-80.
- [113] Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Lwasaki H, Omori H, Yamaoka N, Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell host & microbe.* 2012;12:109-16.
- [114] Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, Chandler NB, Rodesch CK, Alvertine KH, Petti CA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* 2009;113:6419-27.

- [115] Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1243-52 e7.
- [116] Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol*. 2013;4:38.
- [117] Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem*. 2013;114:532-40.
- [118] Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010;191:677-91.
- [119] Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117:953-9.
- [120] Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010;207:1853-62.
- [121] Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immunol*. 2009;1:194-201.
- [122] Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2013;190:4136-48.
- [123] Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leuk Biol*. 2005;78:1025-42.
- [124] Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Hector A, Vitkov L, Wiedenbauer EM, Krautgartner WD, Stoiber W, Belohradsky BH, Rieber N, Kormann M, Koller B, Roscher A, Roos D, Griese M, Eickelberg O, Doring G, Mall MA, Hartl D. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med*. 2010;16:1018-23.
- [125] Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*. 2009;16:1040-52.
- [126] Wang Y, Chen Y, Xin L, Beverley SM, Carlsen ED, Popov V, Chang KP, Wang M, Soong L. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Infect Immun*. 2011;79:1124-33.
- [127] Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000639.

- [128] Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muniz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, Chacón-Salinas R, Estrada-Parra S, Estrada-García I. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2009;89:29-37.
- [129] Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Experiment Med*. 2011;208:2251-62.
- [130] Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*. 2007;9:1162-71.
- [131] Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. 2006;16:401-7.
- [132] Sumby P, Barbian KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, Bailey JR, Parnell MJ, Hoe NP, Adams GG, Deleo FR, Musser JM. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2005;102:1679-84.
- [133] Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. 2006;16:396-400.
- [134] Walker MJ, Hollands A, Sanderson-Smith ML, Cole JN, Kirk JK, Henningham A, McArthur JD, Dinkla K, Aziz RK, Kansal RG, Simpson AJ, Buchanan JT, Chhatwal GS, Kotb M, Nizet V. DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nat Med*. 2007;13:981-5.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La paracoccidioidomicosis (PCM) es una micosis sistémica y endémica restringida a ciertas regiones de América Latina; es causada por el hongo dimórfico *Paracoccidioides* spp, y se presenta principalmente en Brasil, Venezuela, Colombia y Argentina. La presentación clínica de la micosis y el curso de la enfermedad varía de paciente en paciente, y aunque muchos individuos están expuestos al hongo solo unos pocos desarrollan los síntomas. Esto podría explicarse, al menos en parte, a la capacidad que tiene el hongo de permanecer viable por muchos años en los tejidos del hospedero infectado. En estudios experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que los PMN juegan un papel importante como células efectoras e inmunomoduladoras en los estadios tempranos de la infección por este hongo, contribuyendo así a la resistencia del hospedero. Los PMN y macrófagos eliminan eficientemente las conidias del hongo, mientras que las levaduras son atacadas principalmente por los PMN, pero estas últimas no pueden ser fagocitadas completamente debido a su tamaño. Recientemente, fue descrita una estrategia extracelular de los PMN, la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que consiste en la liberación del ADN nuclear con un alto contenido de histonas asociadas a proteasas. En ese sentido, la producción de las NET están asociadas con la supervivencia o destrucción de diferentes microorganismos, en los que se incluyen hongos de importancia médica como *Aspergillus* spp. y *C. albicans*. Estos trabajos indican que este mecanismo podría estar operando de una manera similar en la respuesta inmune contra *P. brasiliensis*.

5. HIPOTESIS: Los neutrófilos humanos producen NETs frente a *P. brasiliensis* como un mecanismo de defensa alternativo a la fagocitosis y a la explosión respiratoria, y ésta respuesta depende del morfotipo del hongo.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) humanos para producir trampas extracelulares (NET) en respuesta a las conidias y levaduras de *P. brasiliensis* y, si este mecanismo existe, determinar su efecto sobre dichas estructuras fúngicas.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la formación *in vitro* de NET por PMN humanos en presencia de diferentes morfotipos (conidias y levaduras) de *P. brasiliensis*.
- Establecer si la formación de NET por PMN humanos frente a *P. brasiliensis* dependen de la fagocitosis y/o la producción de ROS.
- Estudiar si el IFN- γ ejerce un efecto sinérgico en la producción de NET en PMN infectados con los diferentes morfotipos de *P. brasiliensis*.
- Evaluar el efecto antifúngico de las NET producidas por PMN humanos frente a *P. brasiliensis*.

7. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*

Susana P. Mejía.^{1,2*}, Luz E. Cano .^{1,2}, Juan A. López.³, Orville Hernandez.⁴
& Ángel González.³

¹ Medical and Experimental Mycology Group, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), carrera 72ª No. 78B 141, Medellín, Colombia.

² School of Microbiology, Universidad de Antioquia, Calle 70 No 52-51, Medellín, Colombia.

³ Basic and Applied Microbiology Research Group (MICROBA), School of Microbiology, Universidad de Antioquia, Calle 70 No 52-51, Medellín, Colombia.

⁴ Cellular and Molecular Biology Unit, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Carrera 72ª No. 78B 141, Medellín, Colombia.

*corresponding author. E-mail address: susanap21@gmail.com

7.1. Abstract

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play an important role as effectors cells and contribute to the resistance of the host against microbial pathogens. PMNs are able to produce extracellular traps (NETs) in response to important medical fungi such as *Aspergillus* spp., *Candida albicans* and *Cryptococcus gattii*. However, NETs production in response to *Paracoccidioides brasiliensis* has not been study yet. In this work, it was demonstrated that human PMNs produce NETs against both conidia and yeasts of *P. brasiliensis*. DPI, an inhibitor of the NADPH oxidase, did not alter the NETs production against conidia, however, this treatment suppressed partially NETs formation against *P. brasiliensis* yeasts. Cytochalasin D or IFN- γ did not affect the production of NETs against the fungus. Additionally, a mutant strain of *P. brasiliensis* with reduced expression of an alternative oxidase induced significant higher levels of NETs in comparison with the wild type strain. Finally, quantification of CFU of *P. brasiliensis* showed no significant differences when PMNs were treated with DPI, DNaseI or Cytochalasin D when compared with non-treated cells. These data establish that human PMNs produce NETs against conidia and yeasts morphotypes of *P. brasiliensis* by independent and a dependent mechanism of reactive oxygen species production, respectively. Nonetheless, this NETs seems to be not effective to kill the fungus.

Keywords: Human Neutrophil, NETs, *Paracoccidioides brasiliensis*, Yeast, Conidia, ROS.

7.2. INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic and pathogenic fungus that causes the most frequent systemic mycosis in Latin American referred as paracoccidioidomycosis (PCM). This mycosis is predominantly found in South America, especially in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina [1-3]. Approximately, 10 million people are infected with *P. brasiliensis*, but only about 1 – 2% develops the mycosis [1, 2]. PCM is more frequent in men than women, especially in those in the economically productive age (30-60 years old) [1, 2, 4-6]. *P. brasiliensis* is characterized by its ability to switch from mycelial to yeast form; the former grows at temperatures between 18-24°C and it is found in the environment while yeast morphotypes grow at 36°C in culture or in the host [1, 7-9]. Infection is caused after inhalation of *P. brasiliensis* conidia, small propagules produced by the mycelial form that reach the lungs, thus starting the infectious process. In 90% of clinically active cases, PCM develops into a chronic systemic and progressive disease which progresses slowly and can take months or even years to develop in some cases, while in the remaining 10% of cases, the disease develops as an acute form [1, 4, 10-12]. Fungal dissemination from the lungs occurs regularly with the emergence of secondary lesions in other organs and systems [1, 4].

In experimental animal models, it has been shown that during the early stages of the infection an acute inflammatory process takes place with involvement of phagocytic cells mainly polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and macrophages [13-15]. This initial inflammatory response is associated with a decrease in fungal burden in the lungs of infected mice [15, 16]. Interestingly, although these phagocytic cells decrease during the subsequent chronic periods, they remain present in an important number [13, 14].

In vitro it has been demonstrated that human neutrophils are involved in the resistance to *P. brasiliensis* infection. These cells can ingest the *P. brasiliensis* yeasts through phagocytosis, but when the yeast is too big, these phagocytic cells form an extracellular vacuole before killing the fungus [17]. Additionally, it has been demonstrated a high activity of NADPH-oxidase, endogenous peroxidase and acid phosphatase during the fungal phagocytosis process [17]. Nonetheless, although the phagocytosis of *P. brasiliensis* and the activation of the respiratory burst take place, these mechanisms seem not to be enough to kill the fungus [18-20].

In additional studies, it has been shown that cytokines such as Interlukine-15 (IL-15), IL-8, Interferon- γ (IFN- γ), Granulocyte macrophage Colony-stimulating factor (GM-CSF) and Tumor Necrosis Factors- α (TNF- α), increase the antifungal effect of these cells [19, 21-24]. Interestingly, the IFN- γ increases the fungicidal activity of PMNs against *P. brasiliensis* especially during the first 24h but not in later periods (48h and 72h), thus suggesting a fungistatic effect [19]. The antifungal activity of the IFN- γ , TNF- α and GM-CSF is exerted in a dose-dependent manner and this response is correlated with production of reactive oxygen species (ROS) [22]. Additionally, IFN- γ in combination with GM-CSF or IL-1 β , exhibit a synergistic effect enhancing the antifungal activity of PMNs against *P. brasiliensis* yeasts [21]. Furthermore, IL-15 induces PMNs fungicidal activity involving dependent or independent mechanisms of ROS [23].

Neutrophils exhibit important roles during the early stages of *P. brasiliensis* infection acting as effectors cells or through immunomodulatory mechanisms thus contributing to the host resistance [16]. However, these studies are grounded in the basic antimicrobial strategies of neutrophils such as phagocytosis, degranulation and respiratory burst; nonetheless, these strategies appear not to be effective to eliminate the fungus. More recently, other defense strategies have been discovered in neutrophils, namely the neutrophil extracellular traps (NETs) [25]. These structures are produced after cell activation and are composed of decondensed chromatin complexed with different cytoplasmatic

proteins, such as histones (H1, H2A, H2B, H3, y H4) and over 30 different PMNs proteins [25, 26]. NETs could be produced by a mechanism dependent or independent on the NADPH oxidase activation and the subsequent ROS production [25, 27]. These network structures can capture the microbes, degrade their virulence factors and finally, eliminate the pathogens [25, 26].

An increasing number of bacteria, fungi, viruses and protozoan parasites have been shown to induce NETs [25, 28-31]. To date, only three fungal species: *C. albicans*, *Aspergillus* spp. and *Cryptococcus* spp. have been reported to activate the production of NETs [32-35]. In addition, calprotectin has been identified as the major antifungal component of NETs, which has the ability to destroy fungal pathogens; this protein acts as a Mn^{2+} and Zn^{2+} chelator, which are recognized as important ions involved in the fungal growth [31]. Moreover, NETs production is induced after recognition of β -glucan present on the cell wall of *C. albicans* through the interaction with the complement receptor 3 (CR3) located on the surface of the phagocytic cells [36]. NETs play an important role against *C. albicans* and *A. fumigatus* mycelial form; due to their big size these fungal structures are not phagocytosed and NETs formation could be a good strategy to stop the fungal spread [31, 32]. *C. gattii* induces extensive NETs but these do not kill the fungus; of interest, these capsulated yeasts produce extracellular fibrils which are associated with its virulence and with the inhibition of PMN-mediated killing [34].

Of note, the induction of NETs by *P. brasiliensis* has not been described so far. Here, we report that human PMN can produce NETs after interaction with both morphotypes of *P. brasiliensis* (conidia and yeasts cells); nonetheless, this mechanism appears to be ineffective to kill the fungus and its production appears to be dependent or independent of ROS according to the fungal morphotype.

7.3 MATERIALS AND METHODS

7.3.1. Strains and media

A strain of *Paracoccidioides brasiliensis* (ATCC-60855; Manassas, VA, USA) isolated from a Colombian patient and characterized by its abundant conidia production was used in this study. The fungus was maintained at 18°C by passage every two weeks on solid synthetic McVeigh-Morton modified (SMVM) medium [37]. Conidia production and purification were assessed as described previously [38]. Briefly, fungal mycelial was amplified by subcultures into liquid SMVM with constant shaking at 150 rpm, 18°C for 2 weeks. The mycelial mass obtained was homogenized, transferred aseptically to Petri dishes containing water agar medium [(a medium poor in carbohydrate) Bacto-agar; Becton Dickinson, New Jersey, USA] and incubated at 18°C for almost 3 months or longer until conidia had been produced. The dishes with the highest levels of sporulation were flooded with a physiologic saline solution containing 0.01% Tween 20, 100 U penicillin and 100 µg streptomycin per mL. Fungal material was scraped from the agar surface with a disposable loop and the suspension transferred to a capped Erlenmeyer flask containing three layers of 3-mm glass beads and shaken for 30 min at 250 rpm to release the conidia. The suspension was centrifuged at 1950 g, 4°C for 30 min. The pellet was resuspended in 7.5 ml PBS and sonicated twice at 4°C, 7 Hz for 15s (Sonicator Branson Ultrasonic, Sonifier, cell disruptor 185, Danbury CT, USA). The sonicated pellet was diluted in 35 ml PBS and layered over 10 ml of 90% Percoll (GE Healthcare Bio-sciences AB, Stockholm, Sweden) in 0.25 mol/L sucrose. The gradients were then centrifuged at 1950 g, 4°C for 60 min, and the pellets were washed twice with a phosphate-buffered saline solution (PBS). The number and viability of

conidia was evaluated by staining with Janus green (Invitrogen, CA, USA). Conidia suspension with a viability higher than 90% were used throughout the experiments [39]. Yeast morphotype were maintained by weekly subcultures in solid Sabouraud medium (Becton Dickinson, New Jersey, USA) supplemented with 0.01% thiamine (Becton Dickinson, New Jersey, USA), 0.014% asparagine (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA), 100 U penicillin and 100 µg streptomycin per ml at 36°C with 5%CO₂. Unless indicated otherwise, yeast cells were grown in Brain Heart Infusion [(BHI), Becton Dickinson, New Jersey, USA] medium broth plus 100 U penicillin and 100 µg streptomycin per ml at 36°C with aeration on a mechanical shaker, and were routinely collected during their exponential growth phase (at 72h). Fungal grown was collected in PBS, and passed twelve times through a 5ml syringe to eliminate clumped fungal cells. The fungal suspension was centrifuged at 1500g, 4°C at 5 min. The viability and number of yeasts were determined by staining with Jannus Green (Invitrogen, CA, USA). The fungal unit was considered as a single cell or a mother cell with 2-7 daughter cells. Fungal cells were counted in a heamocytometer and resuspended in RPMI 1640 culture medium (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA) to obtain the desired number.

Moreover, a mutant strain of *P. brasiliensis* (PbAOX) [40] with a modified expression of an alternative oxidase (AOX) gen involved in the detoxification or reduction of ROS, using antisense RNA technology [40], were also used in the present investigation.

In addition, a *Candida albicans* strain (ATCC 90028) was also used as a positive control of NETs production by PMN [32, 36]; this strain was maintained by three days sub-culturing in solid Sabouraud medium at 35°C with 5%CO₂, and collected during their exponential growth phase (48h). Fungal mass was isolate by scrapping the medium's surface and resuspended in RPMI 1640 medium. The viability and number of yeast were determinate by staining with Jannus Green and counting in a heamocytometer.

7.3.2. Reagents

Recombinant human IFN- γ , Phorbol Myristate Acetate (PMA), Diphenyleneiodonium chloride (DPI), Cytochalasin D and Lipopolysaccharides (LPS) were purchased from SIGMA-Aldrich (St. Louis, USA). DNaseI was provided by Mo-BIO Laboratories Inc. CA, USA. Sytox Green was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, CA, USA).

7.3.3. PMNs Isolation

Blood samples were obtained from healthy human volunteers by following the guidelines of resolution 8430 of 1993 from the Ministry of Health from Colombia. Blood was collected in EDTA-containing Vacutainer tubes (BD Biosciences, San Jose, CA). Polymorphprep [(density 1.113 g/ml;460mOsm); Axis Shield, Oslo, Norway] was used for blood gradient centrifugation at 550 g. PMNs were collected and washed with HBSS buffer (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA) and diluted in RPMI 1640 medium. The number and viability of cells were evaluated by trypan blue exclusion (Invitrogen, CA, USA). PMN cells with a viability higher to 95% were used.

7.3.4. NETs Visualization

For staining techniques, we used glass coverslides 12mm (Fisherbrand, United Kingdom) into 24-well non-treated culture plates (Brand, Germany). In the first step, neutrophils were adhered on the glass coverslide, 2×10^5 PMNs/wells were seeded and incubated for 30min at 37°C. Then, they were inoculated with 4×10^4 yeasts of *P. brasiliensis* in 250 μ l of RPMI 1640 medium and incubated for 3h at 37°C. In some wells PMA (25nM) was added to stimulate neutrophils. NETs were stained with a rabbit anti-human elastase AB21595 (Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:250 diluted in 10% PBS-BSA (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA); finally, an Alexa 488-conjugated goat anti rabbit IgG (Invitrogen, CA, USA) 1:500 diluted in PBS was used as the secondary antibody. Additionally, DNA

was dyed with 1µg/ml of propidium iodide (Invitrogen, CA, USA) and the fungus with 100µg/ml of calcofluor white (Fluka-SIGMA-Aldrich, Buchs, Switzerland) following the manufacture's instructions. NETs were visualized using an inverted fluorescent microscope Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) and the images captured using a camera Axio cam Icm1.

7.3.5. Quantification of extracellular DNA

The co-cultures of *P. brasiliensis* at the concentrations described before with 2×10^5 freshly isolated human PMNs were carried out in 200µl RPMI 1640 medium using black 96 well culture plates (Greiner, Germany) for 3h at 37°C. Some wells were stimulated with PMA (25nM), LPS (3µg/ml) or *C. albicans* (4×10^4 yeasts).

For inhibiting the NETs formation, PMNs cultures were pre-incubated with 10 µg/ml cytochalasin D (an inhibitor of phagocytosis) and 16µM DPI [an inhibitor of the NADPH oxidase] for 30 min at 37°C and then *P. brasiliensis* yeasts or conidia were added. In addition, in some experiments 100U/ml of DNaseI were added at the same time with the stimulus in order to degrade the DNA released. In addition, some PMNs were pre-treated with IFN-γ (100UI) 1h before the second stimuli were added. Finally, 5 µl of Sytox green at 5 µM concentration were added to the wells and fluorescence was measured (excitation 480nm and emission 530nm) in a spectrofluorometer (Spectra Max Gemini-Molecular Devices, Silicon Vally, CA, USA).

7.3.6. Killing assay

In order to determine the NETs efficiency to kill *P. brasiliensis*, a Colony Forming Unit (CFU) assay was preformed. Co-incubation of *P. brasiliensis* yeasts with freshly human PMNs in 96 well culture plates (Brand, Germany) was carried out as described before. Some wells were treated with 16 µM DPI, 100 U/ml DNaseI, and 10 µg/ml of Cytochalasin D. After 3h of incubation at 37°C, wells were

aspirated and washed with PBS. Dilutions 1:10 and 1:100 were made, and 100 µl of each dilution was plated on BHI agar supplemented with 4% (vol/vol) horse serum, 500µM EDTA and 1% glucose (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA). Cultures were incubated at 36°C with 5%CO₂. CFUs were counted after three days of cultured and until no increase in colony numbers were observed.

7.3.7. Statistical analysis

Mann-Whitney or ANOVA tests were used for analyzing the results, and post analysis for ANOVA test was don using the bonferroni correction method. A *P* value <0.05 was considered statistically significant. All statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism software version 5.0 (Graph Pad software, La Jolla, CA, USA).

7.4. RESULTS

7.4.1. *Paracoccidioides brasiliensis* induce NETs formation

Induction of NETs by human neutrophils was evaluated after interaction with the *P. brasiliensis* yeast morphotype by using fluorescence microscopy. PMA were used as positive control as previously reported [25, 32]. NET formation was corroborated in confocal images using both anti-elastase and PI. Non-stimulated neutrophils did not produce NETs (Fig. 1); by the contrary, activation of these phagocytic cells with PMA showed NET production; in addition, most of the cells treated with PMA reached the final phase of NETosis whit most of the cell promoting these characteristic structures (Fig. 1). As shown in figure 1, NET formation was observed in human neutrophils after 3 h of infection with *P. brasiliensis* yeasts. As indicated in the figure 1, *P. brasiliensis* yeast cells, stained with calcofluor white, were in close contact with NET structures.

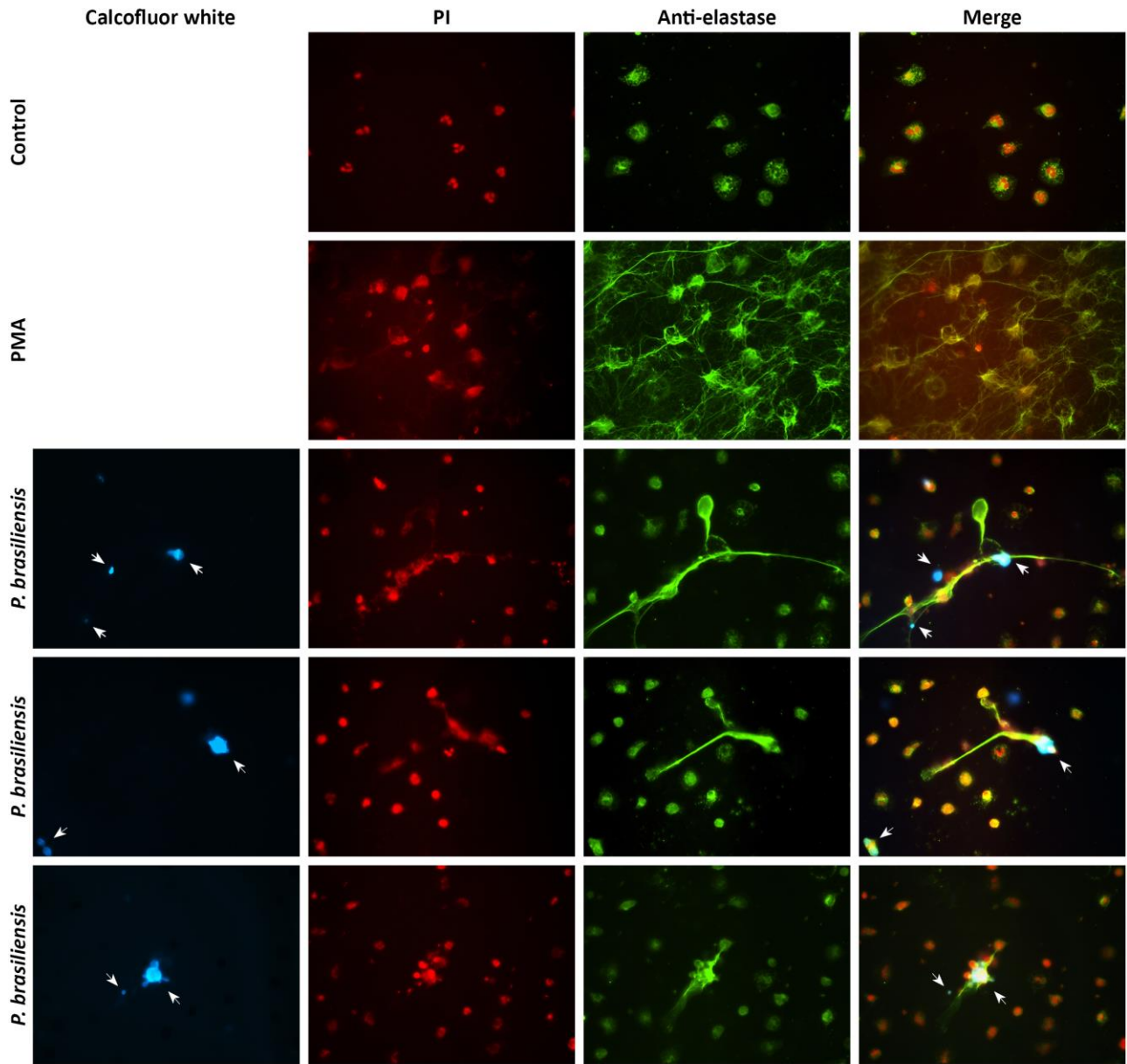


Figure 1. *Paraocidioides brasiliensis* promotes NET formation by neutrophils. Human neutrophils were isolated and infected with *P. brasiliensis* yeasts at a ratio of 1:5 (*P. brasiliensis* : neutrophil); these co-cultures were incubated for 3h as described in Materials and Methods section. Alternatively, neutrophils were treated with PMA [Phorbol Myristate Acetate, (positive control)] to induce formation of NETs. Extracellular DNA was confirmed by immunofluorescence microscopy to be NETs by staining for elastase (anti-elastase; green), and DNA [PI (Propidium iodide; red)]. In addition, fungal

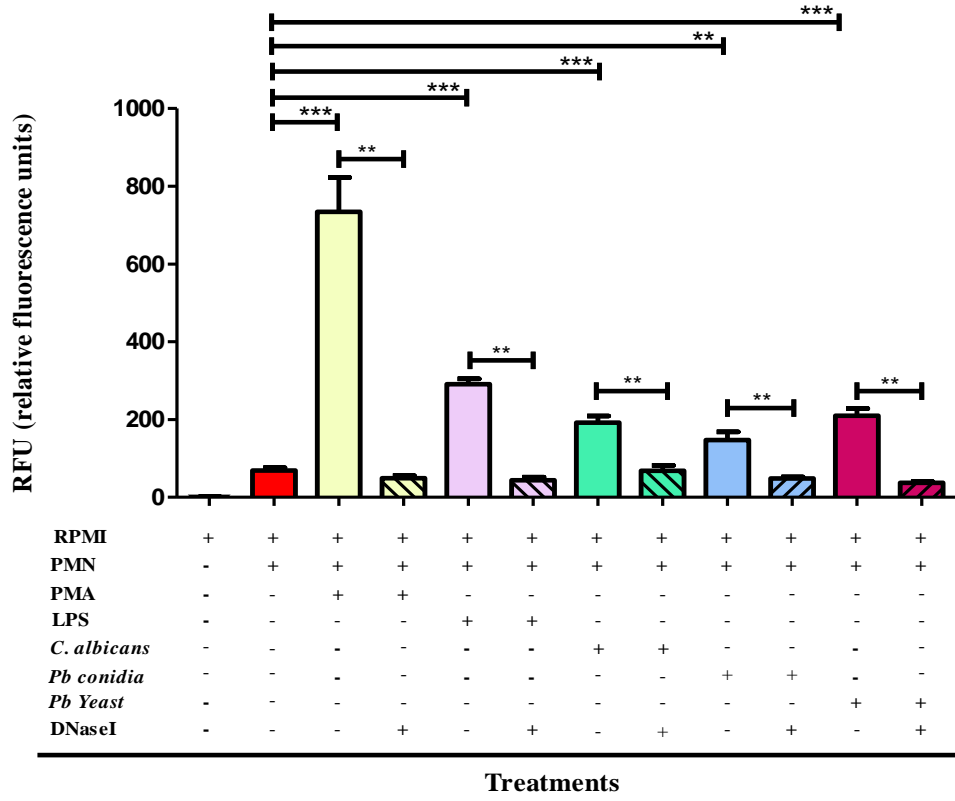
cells were stained with Calcofluor white (blue). Arrows head indicate *P. brasiliensis* yeast cells in close contact with NET structures. Images were captured using a camera Axio cam Icm1 using a 63X objective.

7.4.2. Quantification of NETs induced by *P. brasiliensis*

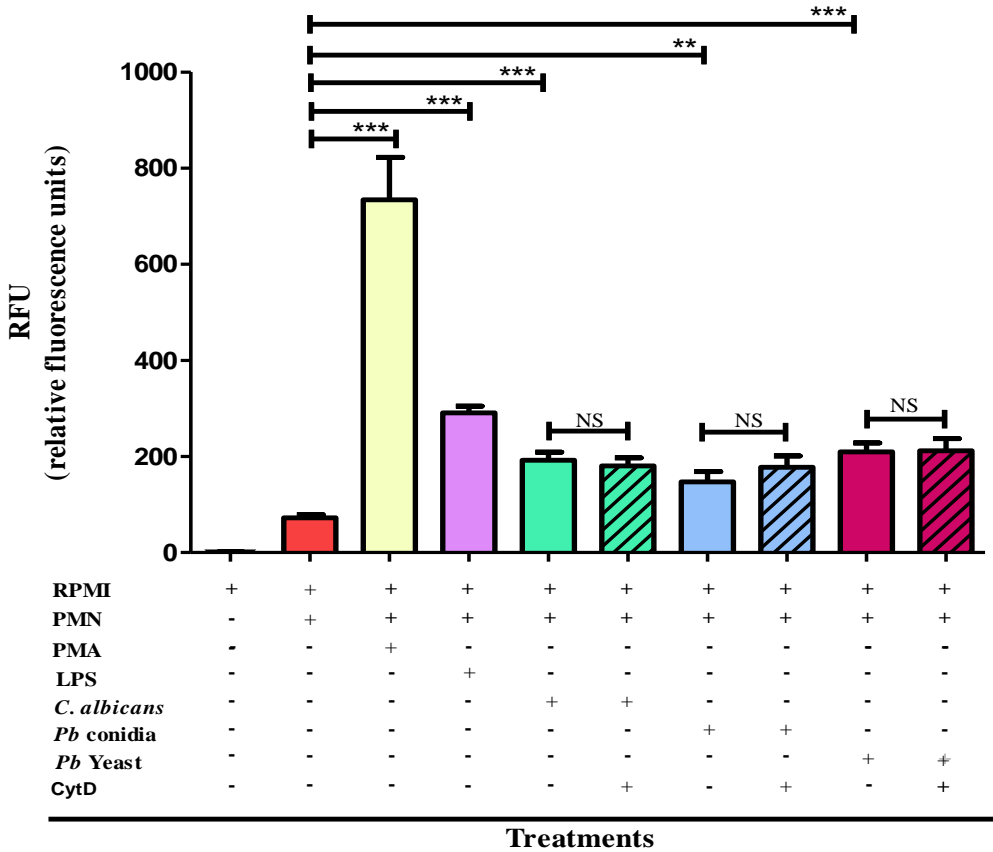
To further characterize the NETs formation, the content of DNA released at extracellular level in the co-cultures of fungus (conidia and yeasts) with PMNs were evaluated using Sytox green staining and measured by fluorescence emission in a spectrofluorometer.

Different ratios of neutrophils and *P. brasiliensis* morphotypes showed a dose-dependent production of NETs after 3h of incubation (data not shown). The quantity of NETs formation induced by *P. brasiliensis* morphotypes was comparable with those induced by LPS and *C. albicans* (Fig. 2A); of note, PMA induced higher amounts of NETs as evidenced by a higher fluorescence. To confirm that the observed fluorescence was due to extracellular DNA released, co-cultures were treated with DNaseI. We observed that after 3h of incubation with DNase, the DNA decreased significantly to a level comparable to the values observed by unstimulated PMN (negative control); this phenomenon was observed with all other stimuli, demonstrating that these structures were composed of DNA (Fig. 2A). Furthermore, to evaluate whether phagocytosis is an important step in the production of NETs against *P. brasiliensis*, cytochalasin D (inhibitor of actin polymerization) was added to the neutrophil-fungus co-cultures. After 3h of incubation the treatment with cytochalasin D did not affect NETs formation (Fig. 2B). Additionally, we tested whether PMN pre-stimulated with recombinant IFN- γ increase NETs production against *P. brasiliensis*; nonetheless, this cytokine apparently did not shown any effect on NETs production (Fig. 2C).

A



B



C

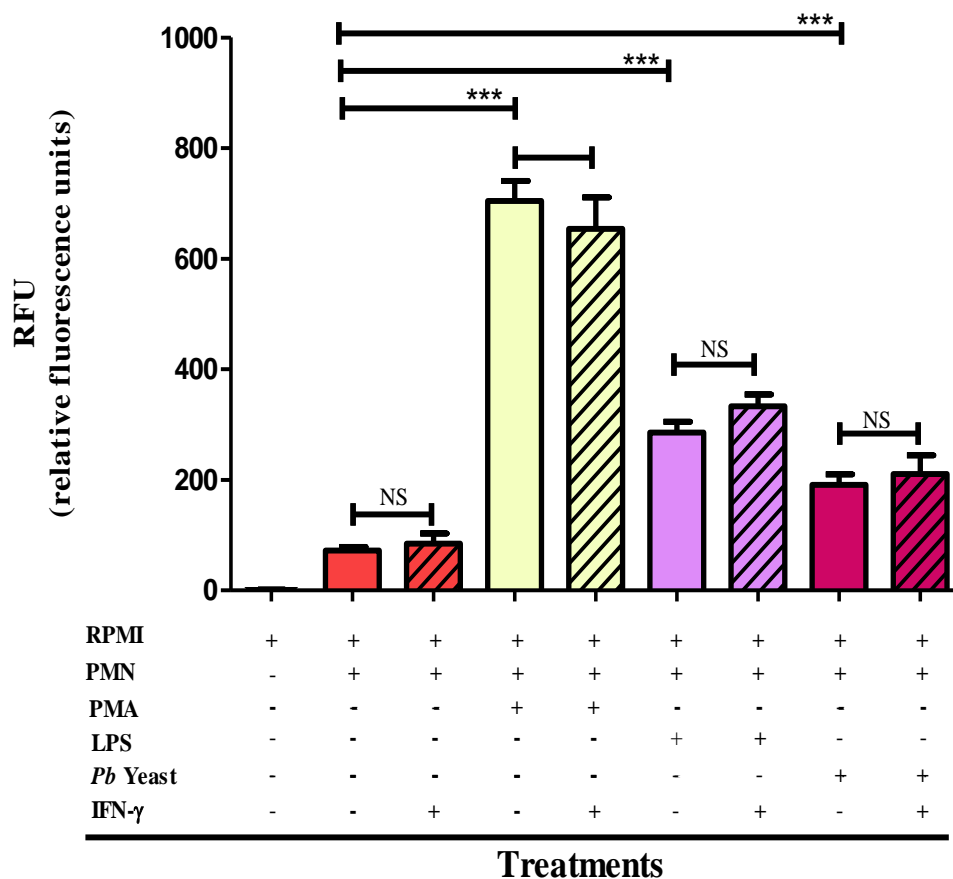


Figure 2. Quantification of NETs production by human PMNs against conidia and yeast morphotypes of *P. brasiliensis*. Extracellular DNA was quantified using Sytox green and measuring its fluorescence intensity (RFU, relative fluorescence units) in a spectrofluorometer as described in Materials and Methods section. PMNs was stimulated with PMA, LPS, *C. albicans* and both morphotypes of *P. brasiliensis* (ATCC 60855) for 3h (A-C). Neutrophils and fungus were prepared as described in Materials and Methods section, and were treated with DNaseI (A) or Cytochalasin D (B). In addition, PMNs were pre-incubated with IFN- γ for 1h and then treated with the different stimuli (C). Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments by triplicate. Asterisks indicate significant difference (*p<0.05; **p<0.001). *Pb*: *Paracoccidioides brasiliensis*. CytD: Cytochalasin D

7.4.3. Formation of NETs by *P. brasiliensis* conidia is independent of ROS production, while yeast morphotype partially depend of the NADPH activation

An inhibitor of NADPH oxidase (DPI) was used to investigate whether NETs formation depends of ROS production (Fig. 3). Previous reports showed that the inhibition of NADPH oxidase with DPI avoids NETs production effectively (26). DPI was added in the cultures of PMNs along with the different stimuli including PMA, LPS, *C. albicans* and *P. brasiliensis* conidia or yeast morphotypes followed by 3h of incubation. PMA treatment was used as a positive control in this experiment as this stimulus acts as an activator of the NADPH oxidase capable to induce NETs formation. We observed that NETs production decreased significantly when the DPI was added to PMNs treated with PMA; this result confirms that the induction of NETs through this stimulus depends of ROS production (Fig. 3). PMN treated with DPI and infected with *C. albicans* also showed a significant reduction in NETs. A similar significant reduction of NETs formation was observed when PMNs infected with *P. brasiliensis* yeasts morphotype were treated with DPI. Interestingly, PMNs stimulated with LPS or infected with *P. brasiliensis* conidia morphotype did not show a decrease in NETs production when the DPI was added.

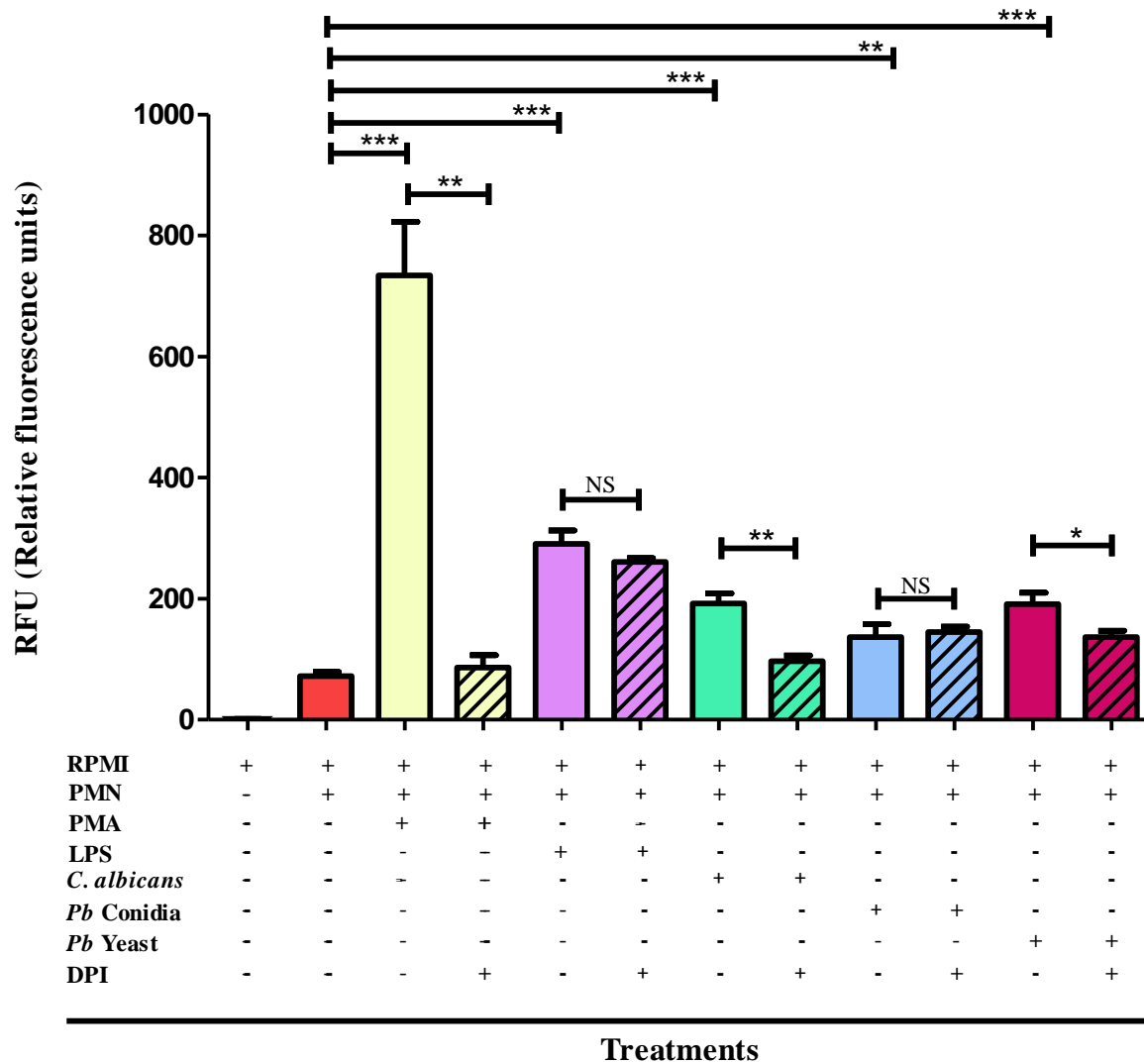


Figure 3. Detection of extracellular DNA by Sytox green after treatment with an inhibitor of NADPH oxidase activation. PMNs was pre-treated whit the DPI inhibitor for 30 min, and then stimulated whit PMA, LPS, infected with *C. albicans* and conidia or yeast of *P. brasiliensis* (ATCC 60855) morphotypes and incubated for 3h. The release of extracellular DNA was determined measuring the fluorecence intensity and using Sytox green. The data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments by triplicate. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$).

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*.

7.4.4. Diminished expression of an alternative oxidase (AOX) in *P. brasiliensis* is correlated with an increased induction of NETs

An alternative oxidase of *P. brasiliensis* (AOX) has been implicated in reduction of ROS, and is considered an important virulence factor in this fungus [40]. In order to determine the role of *P. brasiliensis* AOX on NETs production, we used a mutant obtained by RNA antisense methodology as described elsewhere [40]). Of interest, we observed that PMNs infected with *P. brasiliensis* yeast cells from the mutant strain (PbAOX) showed a higher and significant NETs formation in comparison with those PMNs infected with the wild type strain (ATCC 60855) or with those fungal cells carrying the empty vector (PbEv60855) (Fig. 4). This result corroborate that ROS may influence the formation of NETs against *P. brasiliensis* yeasts.

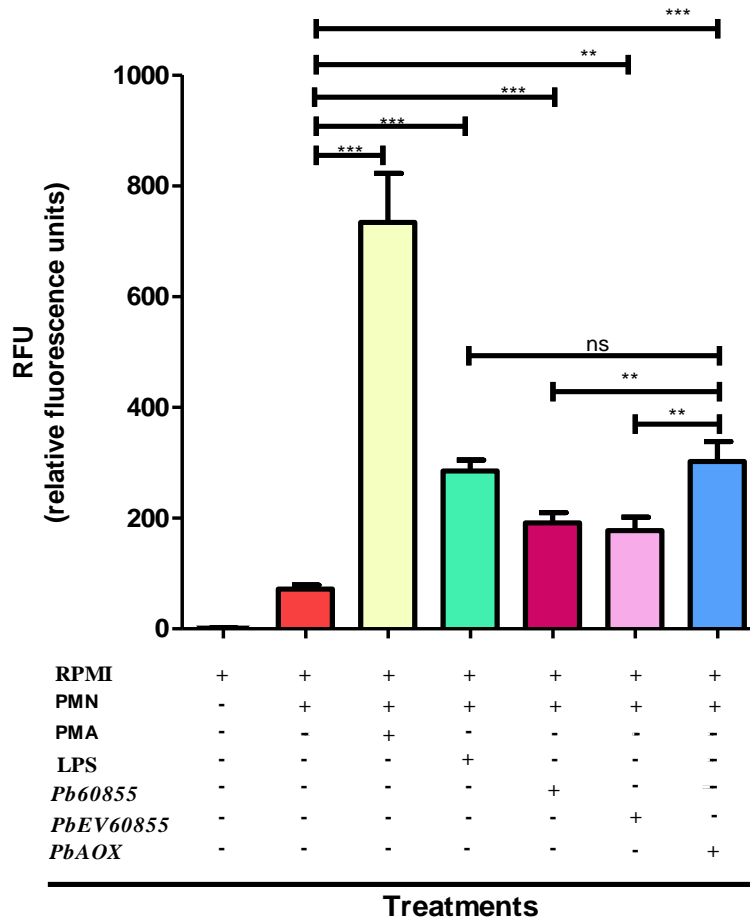


Figure 4. A *P. brasiliensis* mutant with diminished expression of an alternative oxidase (AOX) induces higher NETs formation. PMNs were co-incubated with a *P. brasiliensis* mutant strain with diminished expression of AOX (PbAOX) or their counterpart the wild type (ATCC60855) or yeast cells carrying the empty vector (PbEv60855) for 3h. The extracellular DNA released was determined by measuring the fluorescence intensity using the Sytox green stain as described in Materials and Methods section. Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments by triplicate. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*.

7.4.5. NETs do not exert a fungicidal mechanism against *P. brasiliensis*

To test the killing capacity of NETs against *P. brasiliensis*, PMNs were co-incubated with *P. brasiliensis* yeast cells and treated with DPI, DNaseI or Cytochalasin D. The fungicidal ability by NETs against *P. brasiliensis* was determined through CFU counting. As shown in figure 5, when the numbers of CFU were compared between the different treatments no significant differences were found. These data suggest that NETs do not show a fungicidal effect against *P. brasiliensis* yeasts; this was mainly confirmed when the activation of NADPH was inhibited, the DNA was degraded or phagocytosis blockade.

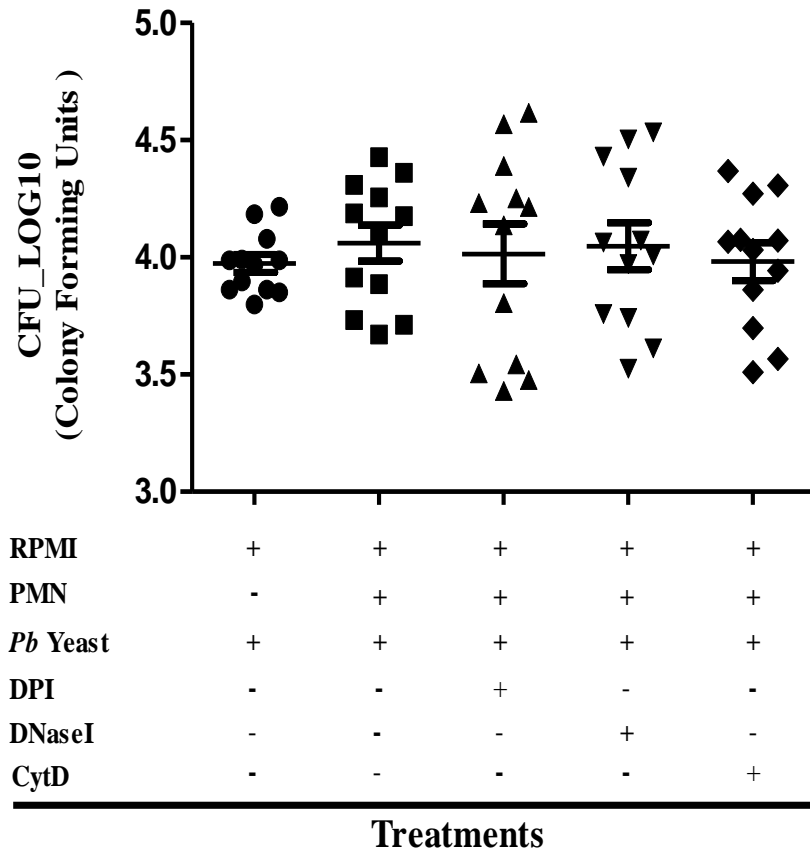


Figure 5. Fungicidal activity of PMNs against *P. brasiliensis* yeasts. Viability of *P. brasiliensis* yeast was determined by colony forming units (CFU) enumeration after the incubation with neutrophils during 3h and in the presence of DPI, DNaseI or Cytochalasin D. Data are represented as mean \pm SEM of four independent experiments by triplicate. Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*. CytD: Cytochalasin D.

7.5. Discussion

PMNs have been described as the principal cells involved in the initial inflammatory response against *P. brasiliensis* [41]. Thus, *in vivo* using a murine model, it has been shown that the initial response observed in the tissue of infected animals is characterized mainly for high infiltration of PMNs which

represent about 85% of cells recruited at the site of infection [41]. These phagocytic cells exhibit several microbicidal mechanisms including dependent and independent oxygen ones; more recently, a new microbicidal and particular mechanism has been described, the neutrophil extracellular traps (NETs), which is characterized by releasing the DNA to an extracellular level complexed with histones and other proteins stored in their granules [25]. Various studies have shown that several fungi of medical importance including *C. albicans*, *Aspergillus* spp. and *Cryptococcus* spp. exhibit the ability to induce NETs [32, 34, 35]. To our knowledge, this is the first report indicating that both conidia and yeast morphotypes of *P. brasiliensis* induce NETs formation by human PMNs. NETs showed the typical structure as it has been reported in previous studies with other pathogens [25, 26]. Moreover, the DNA released by these cells was confirmed by measuring the fluorescence intensity by a spectrofluorometer. However, no significant differences were found in NETs production between *P. brasiliensis* morphotypes.

NETs could be induced by several stimuli such as PMA, microbial product such as LPS, and β -glucan, as well as cytokines including the IL-8 [25, 26, 36]. For instance, in previous studies it has been reported that the co-incubation of PMNs with *P. brasiliensis* yeast results in an inhibition of apoptosis of these phagocytic cells, a mechanism that was associated with an increase in the IL-8 production by PMNs [24]; thus, the blockage of this cytokine reverted the inhibitory effect of the apoptosis. Of note, the level of this cytokine it has been associated with NETs formation as described by Volker *et al* [25]. Although we did not determine the levels of this cytokine in the present work we could hypothesize that IL-8 may be, at least in part, one of the molecules responsible for the activation of PMNs with the subsequent NETs formation. More studies are needed in order to confirm this hypothesis.

Interestingly, when we used the DPI, an inhibitor of the NADPH oxidase activation, we found that PMNs infected with *P. brasiliensis* conidia morphotype and treated with the inhibitor, the NETs production was not affected. By the contrary, when the yeast cells morphotype was analyzed, we

observed that the addition of DPI to the PMN-fungal co-cultures, suppressed partially the NETs production. These results indicate that *P. brasiliensis* conidia induce NETs formation through a mechanism independent of ROS, while *P. brasiliensis* yeasts morphotype depended in certain extent on ROS production through activation of NADPH oxidase.

Other reports have been described the involvement of the NADPH oxidase in NETs formation. Thus, when NADPH oxidase activity was restored by gene transfer methodologies in neutrophils derived from stem cells of patients suffering chronic granulomatous disease, it was observed a re-establishment of NETosis and a restoration of fungal defense against *A. nidulans* [33, 42].

Additionally, PMNs co-cultured with *A. fumigatus* and treated with DPI, it was completely abolished the NETs formation [34]. On the other hand, *C. albicans* in the presence of β -glucan and extracellular matrix proteins showed that NETs production was independent of NADPH oxidase activation [36].

On these lines, the cell wall in *P. brasiliensis* is the primary structure that is recognized by the immune system cells and is one of the most variable structures in the different morphotypes of this fungus, especially in the polysaccharides composition [7, 8]. Yeast morphotype has higher proportions of α -1,3-glucan structure and lesser of β -1,3-glucan ones, while mycelial and conidia morphotypes are composed mainly by β -1,3-glucan [7, 8]. Studies on *C. albicans* reported that the formation of NETs is induced after the recognition of β -glucan by the complement receptor 3 (CR3) in PMNs [36]. In the present study, we found that conidia induce NETs formation through a mechanism independent of ROS production; thus, it could be possible that the recognition of this morphotype is through the β -glucan present on the conidial surface and the dectine-1 receptor, CR3 or other pattern-recognition receptors (PRRs) present on the surface of the phagocytic cells; while *P. brasiliensis* yeast morphotype, which cell wall is composed mainly by α -glucan, induce NETs structures through a mechanism partially dependent of ROS production; in the later case, the recognition of yeast cells could be through a receptor different to dectin-1 or CR3; this differential recognition may induce or not the NADPH

oxidase activation with the subsequent ROS production and NETs formation. In the NETs production mechanism independent of ROS, the PMNs rapidly expulse their nuclear content via vesicular secretion yielding NETs and live intact cytoplasts that continue to crawl and digest microbes. Currently, there are no reports on α -glucan receptors, but it has been found that this molecule acts as a decoy ligand on β -glucan receptor [43]. More studies are needed in order to determine what components of *P. brasiliensis* morphotypes and which PRRs present on PMNs are involved in the recognition of fungal cells and subsequent NETs formation.

NETs seem to bind a broad range of microbes. Most of microbial surfaces are anionic in nature and the interaction of highly cationic proteins with the microbial surface is well documented [44]. Indeed the binding of NETs to their microbial target could dependent on this kind of interactions. Many microbes evade NETs binding by modifications of the bacterial surface reducing the affinity for these interactions [44]. On the same token, melanin is a virulence factor described in several fungi including *P. brasiliensis* and is found in both morphotypes [45]. Its presence in the cell wall can alter the fungal cell surface charge as shown to occur with melanization in *C. neoformans*, which contributes to inhibition of phagocytosis [46, 47]. Although the phagocytosis was not necessary to induce the NETs formation, as observed when Cytochalasin D was used, it is possible that melanin might be a good candidate for causing the inefficient NETs response against *P. brasiliensis*.

Several studies have been shown that the IFN- γ enhances the antifungal activity of murine and human PMNs against *P. brasiliensis* [21]. In addition, the IFN- γ in combination with others cytokines exhibits a synergistic enhancing effect on the PMNs antifungal activity [22]. In the present study, we evaluated the effect of IFN- γ on NETs production; however, we found that this cytokine did not induce or enhance the production of these structures. Here, we performed the experiments pre-activating the PMNs only 1h before using the different stimuli, including infection with *P. brasiliensis* conidia or

yeast morphotypes. Thus, it is possible that the activation of IFN- γ could apparently take longer or it is not involved in the NETs formation.

On the other hand, one of the defense strategies exhibited by PMNs against *P. brasiliensis* is the production of ROS, such as superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH) [18, 20]. These oxidizing agents may ultimately alter the bioenergetic status of the cell and affect essential metabolic pathways that decreases fungal viability [48]. In addition, ROS can active the production of NETs [26]. As a counterpart, *P. brasiliensis* can also produce anti-oxidant molecules that may protect itself from the oxidant molecules produced by the immune cells [49-51]. When treated with DPI, production of NETs induced by *P. brasiliensis* yeasts morphotype decreased, but the phenomenon was not totally suppressed, suggesting that this mechanism was partially dependent of ROS. Contrary, PMNs co-incubated whit conidia and treated whit DPI, it was not affected the production of NETs, suggesting that this mechanism was independent of ROS.

Recently, it was described in *P. brasiliensis*, an enzyme named alternative oxidase (AOX) involved in the detoxification mechanisms by the fungus [40]. Here, we evaluated the relevance of this enzyme in the production of NETs; we found that PMNs infected with the mutant strain (PbAOX, with decreased expression of this enzyme), showed a higher NETs formation in comparison with its counterpart wild type or the strain carrying the empty vector. Thus, we can hypothesize that the presence of AOX could inhibit the NET formation as a mechanism that allow the fungus to escape from the immune system.

Moreover, production of NETs was not efficient to kill *P. brasiliensis* yeast morphotype. We did not find any difference in the CFU counts when compared the different treatments that reduce or inhibit NETs formation (DNase and DPI). These data indicate that *P. brasiliensis* yeast is killed in a NET-independent fashion. Taken together, our results show that NETs may be involved in prevention further spreading of the fungus. Additionally, we can hypothesize that the proteins present in the NETs structures may have a fungistatic effect against *P. brasiliensis* yeast, possibly by sequestration of iron

or calcium (lactoferrin and calprotectin, respectively) [25, 31]. More studies are needed in order to identify what molecules are involved in the fungistatic mechanism exerted by NETs.

7.6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), Bogotá, Colombia, grant No. 2213-519-28621 and the Research Committee (CODI) of the Universidad de Antioquia through the Sustainability Strategy Program 2012-2013. Additional support was provided by the Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

7.7. Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

7.8. REFERENCES

- [1] Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:89-117.
- [2] Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011;49:785-98.
- [3] Negroni R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). *Int J Dermatol.* 1993;32(12):847-59.
- [4] Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobon AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semina Respir Crit Care Med.* 2008;29:182-97.
- [5] Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microb Rev.* 2011;24:296-313.
- [6] Stevens DA. The interface of mycology and endocrinology. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:133-40.
- [7] Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1972;110:208-18.
- [8] Kanetsuna F, Carbonell LM. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1970;101:675-80.

- [9] Tomazett PK, Felix CR, Lenzi HL, de Paula Faria F, de Almeida Soares CM, Pereira M. 1,3-beta-d-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. *Fungal Biol.* 2010;114:809-16.
- [10] Marques SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment updating. *AnBrasDermatol.* 2013;88:700-11.
- [11] Londero AT, Melo IS. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia.* 1983;82:49-55.
- [12] Restrepo A, Tobon A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennetts JE, Dollin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 6th edition ed. Philadelphia, P.A: Elsevier; 2005.3062-8.
- [13] Lopera D, Naranjo TW, Cruz OG, Restrepo A, Cano LE, Lenzi HL. Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1232.
- [14] Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol.* 2003;41:391-9.
- [15] Gonzalez A, Restrepo A, Cano LE. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Mycopathologia.* 2008;165:313-30.
- [16] Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol.* 2006;79:1202-13.
- [17] Dias MF, Filgueira AL, de Souza W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. *Microsc Microanal.* 2004;10:215-23.
- [18] Dias MF, Mesquita J, Filgueira AL, De Souza W. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. *Med Mycol.* 2008;46:241-9.
- [19] Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999;37:261-7.
- [20] Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999;37:19-24.
- [21] Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000;38:177-82.
- [22] Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007;45:27-33.

- [23] Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peracoli MT, Soares AM. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine*. 2008;41:48-53.
- [24] Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peracoli MT, Soares AM. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. *Scand J Immunol*. 2009;69:73-9.
- [25] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532-5.
- [26] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176:231-41.
- [27] Pilaszek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010;185:7413-25.
- [28] Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:6748-53.
- [29] Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, McFadden G, Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013;13:169-80.
- [30] Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012;12:109-16.
- [31] Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000639.
- [32] Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1243-52 e7.
- [33] Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaniananda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latgé JP, Brakhage AA, Gunzer M. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000873.
- [34] Springer DJ, Ren P, Raina R, Dong Y, Behr MJ, McEwen BF, Bowser SS, Samsonoff WA, Chaturvedi S, Chaturvedi V. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PloS One*. 2010;5:e10978.

- [35] Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular microbiol.* 2006;8:668-76.
- [36] Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013;190:4136-48.
- [37] Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* 1980;12:279-81.
- [38] Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patino MM. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vety Mycol.* 1986;24:247-50.
- [39]. del PJM, Restrepo A, Garcia LF, Cano LE. Separation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia through percoll gradients. *Med Mycol.* 2004;42(4):349-53.
- [40] Ruiz OH, Gonzalez A, Almeida AJ, Tamayo D, Garcia AM, Restrepo A, McEwn JG. Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1353.
- [41] Cock AM, Cano LE, Velez D, Aristizabal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42:59-66.
- [42] Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, Chandler NB, Rodesch CK, Albertine KH, Petti CA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* 2009;113:6419-27.
- [43]. Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:1366-70.
- [44] Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Heriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular microbiol.* 2007;9:1162-71.
- [45] Gomez B, Nosanchuk JD, Restrepo A, Hamilton AJ, Gómez BL, Cano LE. Detection of melanin-like particles in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun.* 2001;69:5760-7.
- [46] Nosanchuk JD, Casadevall A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun.* 1997;65:1836-41.
- [47] White LP. Melanin: a naturally occurring cation exchange material. *Nature.* 1958;182:1427-8.

- [48] Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;72:1091-109.
- [49] Maricato JT, Batista WL, Kioshima ES, Feitosa LS, e Brito RR, Goldman GH, Mariano M, Puccia R, Lopes JD. The *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 antigen is encoded by a putative member of the flavoproteins monooxygenase family. *Fungal Genet Biol*. 2010;47:179-89.
- [50] Dantas AS, Andrade RV, de Carvalho MJ, Felipe MS, Campos EG. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. *Mycol Res*. 2008;112:747-56.
- [51] Campos EG, Jesuino RS, Dantas Ada S, Brigido Mde M, Felipe MS. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res*. 2005;4:409-29.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo provee la primera evidencia que los neutrofilos humanos producen NET frente a conidias y levaduras de *P. brasiliensis*; sin embargo, este mecanismo de defensa no es efectivo en la eliminación del hongo. La producción de las NET frente a conidias y levaduras de *P. brasiliensis* podría darse de una forma independiente o dependiente de la producción de ROS, respectivamente. Adicionalmente, la producción de estas estructuras podría estar relacionada con la virulencia de la cepa a través de la expresión de moléculas tales como la oxidasa alternativa (AOX) que le provee al hongo la capacidad de alterar los mecanismos oxidativos que se producen en el hospedero una vez se activa la respuesta inmune innata.

9. PERSPECTIVAS

Estos primeros hallazgos nos permiten visualizar estudios futuros que podrían ser direccionados a esclarecer si las NET están ejerciendo un efecto fungistático contra *P. brasiliensis* y como la proteína AOX puede estar modulando la formación de estas trampas. También se podría evaluar el efecto que desencadena la presencia de β -glucanos o de otras moléculas presentes en la superficie de las conidias y levaduras de *P. brasiliensis* sobre la producción de NETs. De igual manera, sería importante evaluar la producción de NETs *in vivo* utilizando el modelo experimental de PCM en ratón.

