

Márcia Cristina Fornazim

***CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS INDUZIDAS POR CÉLULAS
LEVEDURIFORMES DE *Paracoccidioides brasiliensis****

CAMPINAS

2011

Márcia Cristina Fornazim

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS INDUZIDAS POR CÉLULAS
LEVEDURIFORMES DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Co-orientador: Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

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

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

F767c Fornazim, Márcia Cristina
Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas
humanas induzidas por células leveduriformes de *Paracoccidioides*
brasiliensis / Márcia Cristina Fornazim. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientadora : Maria Heloisa Souza Lima Blotta ; Ronei Luciano
Mamoni

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3.
Células dendríticas. 4. Linfócitos T. 5. Citocinas. I. Blotta, Maria
Heloisa Souza Lima. II. Mamoni, Ronei Luciano. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em Inglês: Phenotypic and functional characterization of human
dendritic cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells**

Keywords: • Paracoccidioidomycosis.
• *Paracoccidioides brasiliensis*
• Dendritic cells
• T lymphocytes
• Cytokines

2.1 Titulação: Doutor em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

2.2 Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Prof^ª. Dr^ª. Eva Burger

Prof^º. Dr^º. Sandro Rogério de Almeida

Prof^ª. Dr^ª. Selma Giorgio

Prof^º. Dr^º. Ricardo Mendes Pereira

Data da defesa: 27.01.2011

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas e no Laboratório de Imunologia Celular do Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância (CIPOI), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

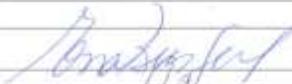
Banca examinadora de Tese de Doutorado

Márcia Cristina Fornazim

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Heloisa De Souza Lima Blotta

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Eva Burger



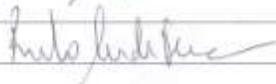
Professor (a) Doutor (a) Sandro Rogério de Almeida



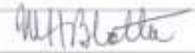
Professor (a) Doutor (a) Selma Giorgio



Professor (a) Doutor (a) Ricardo Mendes Pereira



Professor (a) Doutor (a) Maria Heloisa De Souza Lima Blotta



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

Data: 27/01/2011

Oração de São Francisco de Assis

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvida, que eu leve a fé;

Onde houver erro, que eu leve a verdade;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, Fazei que eu procure mais

Consolar, que ser consolado;

Compreender, que ser compreendido;

Amar, que ser amado.

Pois, é dando que se recebe,

É perdoando que se é perdoado e,

é morrendo que se vive para a vida eterna.

DEDICATÓRIA

Um dia um Anjo declarou que tu eras cheia de Deus.

Meu Anjo,

Quero agradecer-te por tudo,

Pelos momentos em que chorei, a Senhora veio carinhosamente me beijou
e me fez sorrir.

Pelos momentos em que perdi a paciência, a Senhora veio com palavras
amenas e doces e me acalmou.

Pelos momentos em que, meu coração estava em pedaços, a Senhora veio
cheia de amor e em curou.

Pelos momentos de alegria, que fez questão de dividir comigo.

Pelos momentos que com muita esperança, pensou junto comigo no nosso
futuro.

Obrigada por ter me ensinado a ter fé, que seja então meu lema e que este
fique em pé, quando todos os outros tiverem caído.

Obrigada por ter me ensinado que a vida é uma prova de resistência, e o
fracasso é apenas uma idéia que também deve ser vencida.

Mãe Marta dedico, este estudo a Senhora e a todos os Anjos de Luz que
contigo fazem morada.

Obrigada por todos os momentos que passamos juntas. A Senhora é a
pessoa a quem eu admiro, amo e respeito, pelo ontem, por hoje, pelo amanhã e
para sempre.

DEDICATÓRIA

Tony,

A união entre duas pessoas é uma construção diária,
Começa como um mero alicerce e pouco a pouco se torna um castelo.....

(Dr. Gusmão Filho)

Ao amor da minha vida, obrigada pelo companherismo, pela cumplicidade,
E por estar sempre presente.

AGRADECIMENTO ESPECIAL,

À minha orientadora

Profa. Dra Maria Heloisa Souza Lima Blotta,

Por toda a ajuda, pela confiança, pela paciência, por sua amizade

e pela credibilidade de permitir

o desenvolvimento deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que em um gesto magnífico me deu a vida e ofereceu-me esta oportunidade.

À Sarita, à Saranani e a todos os demais da sua equipe que nos meus momentos difíceis e de muita alegria sempre estiveram do meu lado. Amo vocês.

Ao meu pai Antonio e a minha mãe Eunice que sempre direcionaram e apoiaram os meus estudos.

Ao Sr. Valdir Tedeschi, que considero meu segundo pai que sempre estava por perto nos finais de semana oferecendo belos sorrisos quando tudo estava tão confuso em meio a tantos gráficos.

Ao meu co-orientador Dr. Ronei Luciano Mamoni pelas idéias no desenrolar deste estudo e estar sempre por perto.

À minha amiga de longa década do CIPOI, Maria Carolina Spago. Quero dizer-lhe que mesmo que a palavra “*obrigada*” signifique tanto, não expressa a imensa gratidão pela ajuda recebida durante este trabalho. Muito obrigada.

Ao coordenador do Laboratório de Imunologia Calular do CIPOI, Dr. Alexandre Eduardo Nowill, pela confiança depositada, pela oportunidade em permitir a realização deste trabalho cedendo o laboratório, pela disposição em ajudar e pela tolerância quanto aos meus horários de trabalho. Muito obrigada.

Ao Rômulo Tadeu de Oliveira por sua colaboração na realização dos testes de ELISA.

Ao Ângelo Brunelli Albertoni Laranjeria pelas sugestões na parte de informática e pelo delicado trabalho de realização das fotos das células dendríticas.

Aos meus grandes Amigos de Americana que constantemente emprestaram os seus ouvidos e gastaram muito do seu tempo comigo: Daniela, Santana e Valdirzinho, Mayara, Eliane e Roberto, Zenaide e João, Jovelina e Claudemir, Hanara, Delmiro (pelas risadas), Juliana e Ronaldo, Crislaine. Muito obrigada pela marca que fizeram em minha vida e tolerância que tiveram comigo durante este período. Obrigada pelos muitos momentos de descontração.

Aos meus fiéis amigos do CIPOI: à Vanair pelo incentivo para o início deste estudo; ao Almir pelas muitas caronas e pela espera, ao Claudinei pela colaboração na compra de material para o desenvolvimento do projeto, ao Flávio pelo apoio em informática, à Ana Leda pela colaboração na citometria de fluxo com a realização da dosagem de citocinas pelo CBA, a Silvia, Gisele e Juliana pelo apoio durante este longo período. Pelas muitas risadas compartilhadas.

A Larissa e Carolzinha pela colaboração e disposição durante a coleta de material dos pacientes no ambulatório.

O meu profundo agradecimento a cada um dos pacientes que concordaram em participar deste estudo, pelo voto de confiança e pela esperança que aqui depositaram.

Aos meus amigos do Laboratório da Pós Munir, Fernanda, Ana Lúcia e Fábio. Obrigada pela disposição em colaborar.

A Luzia Lyra funcionária do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas e ao funcionário Edson Aparecido Luz do

Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, que gentilmente cultivaram as células leveduriformes da cepa do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

À funcionária Silmara de Souza do Laboratório de Imunologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, pela colaboração na realização dos testes de imunodifusão.

Aos professores Dra Selma Giorgio, Dr. Ricardo Pereira, Dr. Sandro Rogério Almeida, Dra Eva Burger e Dr. Plínio Trabasso pelas sugestões e por aceitarem o convite para participar da banca de avaliação deste trabalho.

À Fundação Salvador Arena pela doação do equipamento de citometria de fluxo (FACSCanto) utilizado nas análises deste trabalho de doutorado.

À FAPESP pela concessão do auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
ConA	Concanavalina A
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DCs	Células dendríticas
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FA	Forma adulta
FJ	Forma juvenil
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos/Macrófagos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
PCM	Paracoccidiodomicose
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb18	Cepa de alta virulência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb265	Cepa de baixa virulência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
q-RT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i>
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
Treg	Linfócitos T regulatórios

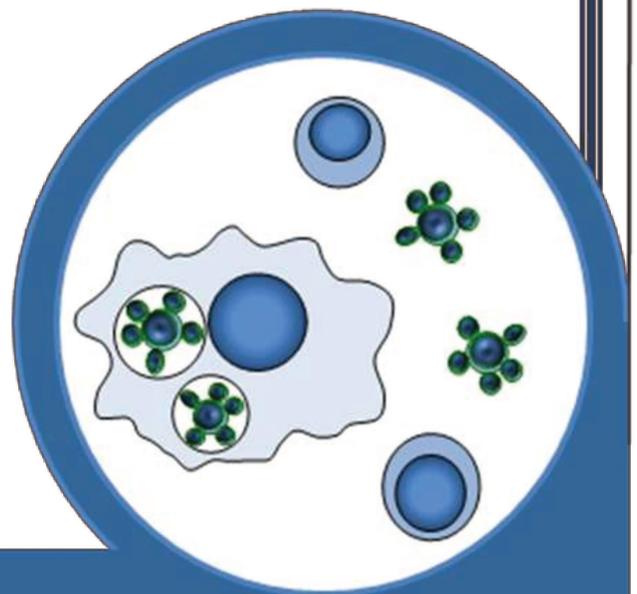
LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estratégia para análise da prolifetação LT CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (CFSE)	69
Figura 2-	Histograma representativo – DCs – D7	77
Figura 3-	Frequência (%) e MFI de células CD83 ⁺	79
Figura 4-	Frequência (%) de células CD1a ⁺	80
Figura 5-	MFI de células CD209 ⁺	81
Figura 6-	Frequência (%) e MFI de células CCR7 ⁺	83
Figura 7-	Fagocitose de partículas de Dextran (citometria de fluxo)	85
Figura 8-	Fagocitose de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (microsc.óptica)	86
Figura 9-	Fagocitose de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (microsc. fluorescência)	87
Figura 10-	Frequência (%) e MFI de células CD80 ⁺	89
Figura 11-	Frequência (%) e MFI de células CD86 ⁺	90
Figura 12-	Frequência (%) de células HLA classe I ⁺	91
Figura 13-	Frequência (%) e MFI de células HLA classe II ⁺	93
Figura 14-	Frequência (%) de linfócito TLR2 ⁺ e TLR4 ⁺	95
Figura 15-	Frequência (%) de células dectina-1 ⁺	96
Figura 16-	Expressão relativa do RNAm para TNF- α	97
Figura 17-	Expressão relativa do RNAm para IL-1 β	98
Figura 18-	Expressão relativa do RNAm para IL-12p35	99
Figura 19-	Expressão relativa do RNAm para IL-23p19	100
Figura 20-	Expressão relativa do RNAm para IL-6	101
Figura 21-	Expressão relativa do RNAm para IL-10	102
Figura 22-	Expressão relativa do RNAm para TGF- β	103
Figura 23-	Resposta proliferativa de linfócito T autólogas	105
Figura 24-	Frequência (%) linfócito T CD4 ⁺ CD45RA ⁺ e CD8 ⁺ CD45RA ⁺	107
Figura 25-	Frequência (%) linfócito T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ e CD8 ⁺ CD45RO ⁺	108
Figura 26-	Frequência (%) linfócito T CD4 ⁺ CD69 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺	109
Figura 27-	Frequência (%) de linfócito T CD3 ⁺ CD8 ^{neg} IL-2 ⁺	111
Figura 28-	Frequência (%) de linfócito T CD3 ⁺ CD8 ^{neg} IL-17 ⁺	112
Figura 29-	Frequência (%) de linfócito T CD3 ⁺ CD8 ^{neg} IL-10 ⁺	113
Figura 30-	Frequência (%) linfócito T CD3 ⁺ CD8 ^{neg} IFN- γ ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	114
Figura 31-	Frequência (%) T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	116

SUMÁRIO

I. Introdução	35
II. Objetivos	53
III. Material e métodos	57
1. Casuística	59
2. Obtenção de células leveduriformes do <i>P. brasiliensis</i>	59
3. Obtenção do antígeno celular do <i>P. brasiliensis</i> (cAg)	60
4. Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	60
5. Geração de células dendríticas (DCs)	61
6. Maturação das DCs	61
7. Caracterização fenotípica das DCs	62
8. Avaliação da capacidade de fagocitose	64
9. Expressão gênica de citocinas por DCs	65
10. Separação de células não aderentes	68
11. Proliferação de linfócitos T autólogos induzida por DCs	68
12. Caracterização fenotípica e expressão de citocinas por linfócitos estimulados por DCs	70
13. Análise estatística	71
IV. Resultados	73
1. Delineamento experimental	75
2. Células aderentes estimuladas durante 7 dias com GM-CSF e IL-4 se diferenciam em células dendríticas com fenótipo imaturo.	76
3. DCs estimuladas com células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> (Pb18 e Pb265) se diferenciam em células com fenótipo maduro.	78
4. DCs estimuladas com células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> (Pb18 e Pb265) induzem aumento da frequência de linfócito TLR2 ⁺ e TLR4 ⁺ , mas não de células dectina-1 ⁺	94
5. A estimulação de DCs com células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> (Pb18 e Pb265) induz a expressão o RNAm para citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias	97
6. DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> são capazes de estimular linfócitos T autólogos	104
6.1.- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> são capazes de induzir a proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ autólogos	104
6.2.- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> são capazes de induzir linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ autólogos ativados e com fenótipo de células de memória/efetoras	106
6.3.- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> são capazes de induzir a expressão de citocinas em linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ autólogos	110
6.4.- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo <i>P. brasiliensis</i> são capazes de induzir linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ autólogos com fenótipo regulatório	115
V. Discussão	117
VI. Conclusões	127
VII. Referências bibliográficas	131
VIII. Anexos	141

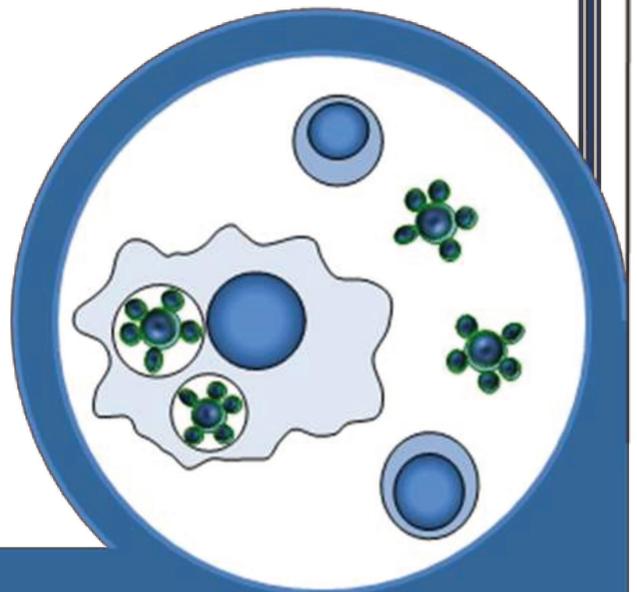
Resumo



A resposta Th1 com a ativação eficiente de macrófagos constituiu o principal mecanismo de defesa na infecção causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Componentes do sistema imune inato que induzem a polarização da resposta adaptativa como as células dendríticas (DCs) e seus produtos foram pouco explorados, principalmente na doença humana. O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente e funcionalmente DCs obtidas a partir de monócitos do sangue periférico (MSP) de indivíduos saudáveis (C), pacientes com a forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da paracoccidioidomicose (PCM), estimuladas *in vitro* por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* das cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência). Em uma segunda etapa pretendeu-se verificar se estas DCs eram capazes de ativar linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos. Os MSP foram cultivados na presença de IL-4 e GM-CSF por 7 dias e posteriormente submetidos à estimulação por células leveduriformes do fungo (Pb18 ou Pb265) ou CD40L (controle positivo) ou somente meio (SE) por 18 horas. DCs derivadas de monócitos do sangue periférico dos 3 grupos estudados (C, FA, FJ) se diferenciam em DCs maduras na presença de células leveduriformes do fungo. Nos pacientes com as FA e FJ as células leveduriformes Pb18 e Pb265 induzem maturação semelhante nas DCs que passam a expressar características morfológicas e fenótipo de células maduras com aumento da expressão dos marcadores de maturação (CD83 e CCR7), das moléculas de co-estimulação (CD80/B7-1 e CD86/B7-2), das moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (HLA-I e HLA-II), dos receptores envolvidos no reconhecimento de antígenos (TLR2, TLR4 e dectina-1) e diminuição da expressão do CD1a e CD209. No grupo C foram observadas as mesmas características de fenótipo acima mencionadas, mas de forma mais evidente em DCs que foram estimuladas com as células leveduriformes da cepa Pb265, quando comparada a Pb18. DCs estimuladas com CD40L mostraram potencial máximo de expressão dos marcadores de superfície. Constatou-se também em DCs do grupo controle uma diminuição da capacidade fagocítica, após 18h de contato com as células leveduriformes do fungo, comprovando o processo de maturação, que foi mais efetivo na presença de Pb265. A análise da expressão

gênica demonstrou que ambas as células leveduriformes do fungo induziram a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-12p35, IL-23p19 e TGF- β . A estimulação das DCs com as células leveduriformes da cepa Pb265 induziu aumento da expressão de IL-6 (C, FA, FJ). Em relação à IL-10 as células leveduriformes Pb265 induziram maior expressão somente nos pacientes (FA e FJ). Na segunda etapa do estudo verificou-se que DCs fenotipicamente competentes foram capazes de estimular a proliferação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos de forma mais acentuada quando eram provenientes de pacientes. Nestes grupos (FA e FJ) também foi constatada uma diminuição da frequência de linfócito T CD4⁺/CD8⁺/CD45RA⁺ e um aumento da frequência células CD4⁺/CD8⁺/CD45RO⁺ e CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺. Inesperadamente, os resultados também mostraram que DCs dos 3 grupos estudados, que foram estimuladas com células leveduriformes do fungo, induziram a proliferação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, em relação às DCs que não receberam estímulos (SE). DCs de pacientes que foram estimuladas por ambas as células leveduriformes do fungo induziram uma maior produção de IL-2, IL-17, IL-10 e IFN- γ por LT/CD3⁺CD8^(neg), quando comparada com DCs do grupo C. Por outro lado, DCs dos 3 grupos estudados (C, FA, FJ) que foram estimuladas células leveduriformes do fungo induziram uma maior produção de IFN- γ por LT/CD3⁺CD8⁺. Em conjunto os resultados do nosso estudo mostraram que a estimulação com células leveduriformes do fungo induz uma população heterogênea de DCs, capazes de dar origem a uma resposta linfocitária mista com proliferação de linfócito Th1 (produtoras de IFN- γ), Th17 (produtoras de IL-17) e células com fenótipo regulatório Foxp3⁺ (produtoras de IL-10).

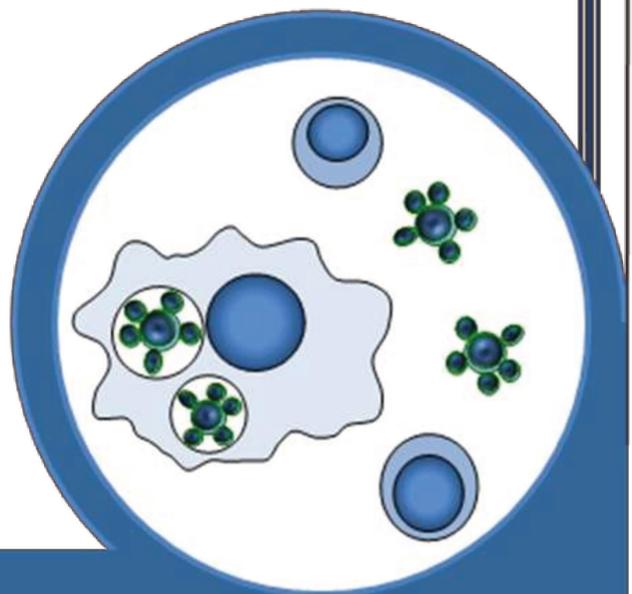
Abstract



A Th1 response with an efficient activation of macrophages is the main mechanism of defense in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Components of the innate immune system that induce the polarization of the adaptive response such as dendritic cells (DCs) and their products have been little explored, particularly in human disease. The aim of this study was to phenotypically and functionally characterize DCs obtained from peripheral blood monocytes (PBM) of healthy individuals (C), patients with the adult form (AF) and juvenile form (JF) of paracoccidioidomycosis (PCM), induced *in vitro* by *P. brasiliensis* yeasts cells of Pb18 (high virulence) and Pb265 (low virulence) strains. In a second step we sought to determine whether these DCs were capable of activating autologous CD4/CD8 T cells. PBM were cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF for 7 days and then stimulated by yeasts cells (Pb18 or Pb265) or CD40L (positive control) or medium only (WE), for 18 hours. PBM of the 3 groups (C, AF, JF) acquired the capacity to differentiate into DCs in the presence of *P. brasiliensis* yeasts cells. In patients with FA and FJ yeast cells induced maturation of DCs with increased expression of maturation markers (CD83 and CCR7), co-stimulatory molecules (CD80/B7-1 and CD86/B7-2), antigen presentation molecules (HLA-I and HLA-II), receptors involved in antigen recognition (TLR2, TLR4 and dectin-1) and decreased expression of CD1a and CD209. DCs from group C showed the same phenotypic characteristics, more evident in DCs that were stimulated with Pb265 when compared to Pb18. DCs stimulated with CD40L showed maximum expression of surface markers. A decrease in phagocytic capacity was detected in DCs of the control group after stimulation with yeast cells, demonstrating the maturation process, which was more effective in the presence of Pb265. The gene expression analysis showed that both strains of yeasts cells induced expression of TNF- α , IL-1 β , IL-12p35, IL-23p19 and TGF- β mRNA. Stimulation of DCs with Pb265 induced increased expression of IL-6 in all groups. Pb265 also induced a higher expression of IL-10 mRNA only in patients (AF and JF). Our study also showed that phenotypically competent DCs were able to stimulate the proliferation of autologous CD4⁺/CD8⁺ cells, mainly in patients. In these groups (FA and FJ) it was also observed a reduction in the frequency of CD4⁺/CD8⁺/CD45RA⁺ and an

increased frequency of CD4⁺/CD8⁺/CD45RO⁺ and CD4⁺/CD8⁺/CD69⁺. Unexpectedly, the results also showed that DCs stimulated with the yeast cells induced proliferation of T lymphocytes CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, compared to DCs that received no stimulation. DCs from patients stimulated by both strains of yeast cells induced a higher production of IL-2, IL-17, IL-10 e IFN- γ by LT/CD3⁺CD8^(neg) compared with DCs from group C. Moreover, DCs from the 3 groups also induced a stronger IFN- γ production by CD3⁺/CD8⁺T cells. Altogether the results showed that stimulation with *P. brasiliensis* yeast cells induces a heterogeneous population of DCs, capable of giving rise to a mixed lymphocyte response with proliferation of Th1, Th17, and Foxp3⁺ cells.

Introdução



1. A paracoccidioidomicose e seu agente etiológico

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica no Brasil e regiões tropicais e subtropicais da América Latina. Além do Brasil, os países mais atingidos pela doença são Argentina, Venezuela, Colômbia e Equador, onde afeta endemicamente a população rural (1-3). Na América Latina cerca de 10 milhões de indivíduos entram em contato com o fungo e aproximadamente 2% desenvolvem a doença (4,5). Esta micose representa um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto poder incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca, principalmente em certos segmentos sociais, como a população rural (6).

No Brasil no período de 16 anos (1980-1995) foram observados 3.181 óbitos por PCM que prevaleceu como endemia nas áreas não metropolitanas. Neste período a PCM destacou-se como a principal micose sistêmica, ocupando o 8º lugar no índice de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as patologias infecciosas, parasitárias e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas com maior prevalência em indivíduos do sexo masculino (7). É uma doença caracterizada por inflamação granulomatosa crônica, supressão da resposta imune celular em indivíduos suscetíveis e formação de granuloma compacto em indivíduos resistentes. A doença pode se desenvolver de forma localizada ou disseminada, atingindo principalmente pulmões, pele, mucosas, linfonodos e o sistema nervoso central (8).

O agente etiológico da PCM é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), cuja capacidade de causar doença depende da transição de micélio para levedura no hospedeiro (4,5). Esta transição morfológica é induzida pelo aumento da temperatura (25°C - 37°C) e modulação da composição da sua parede celular (9,10). A temperatura parece ser o único fator que interfere no dimorfismo do *P. brasiliensis* e o torna capaz de colonizar, invadir e sobreviver no hospedeiro. Cepas incapazes de diferenciar-se em células leveduriformes, não causam a doença (11).

A α -(1-3) glucana é um homopolímero de glicose com ligações α -glicosídicas presente na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis*, enquanto a β -(1-3) glucana predomina na forma miceliana do fungo. Concentrações elevadas de α -(1-3) glucana na parede celular das leveduras foram associadas a maior virulência. Não somente no *P. brasiliensis*, mas em vários fungos de importância médica, verificou-se que a redução da α -(1-3) glucana pela passagem em animais de laboratório não tem efeito no crescimento *in vitro*, mas atenua fortemente a virulência em modelos murinos de infecção respiratória (9,12)

Na PCM uma forte resposta inflamatória foi observada na infecção experimental com cepas de baixa virulência do *P. brasiliensis* (Pb265) com maior teor de β -(1-3) glucana, comparada a resposta às cepas de alta virulência (PbHC), ricas em α -(1-3) glucana e com baixas concentrações de β -(1-3) glucana, sugerindo que diferenças na concentração da β -(1-3) glucana na parede celular poderia explicar as diferenças encontradas entre as cepas (13, 14, 15).

A baixa virulência da cepa Pb265 de *P. brasiliensis* vem sendo atribuída a uma maior exposição da β -(1,3) glucana em sua parede, o que levaria a maior capacidade de reconhecimento pelos fagócitos e produção de TNF- α . Vários trabalhos mostraram que a atividade fungicida de monócitos humanos é significativamente maior contra a cepa Pb265 comparada a Pb18, que possui maior teor de α -(1,3) glucana. Por outro lado, em trabalho recente verificamos que a cepa Pb265 também é forte indutora de IL-10 sugerindo que um balanço adequado das concentrações de TNF- α e IL-10 poderiam contribuir para uma resposta imunológica mais eficaz contra o fungo, impedindo uma resposta inflamatória exacerbada (14, 15, 16).

A PCM é adquirida pela inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, que atingem os pulmões onde se diferenciam em células leveduriformes que, a partir do foco primário de infecção, se disseminam por via linfo-hematogênica para diferentes órgãos ou sistemas (17).

A maioria dos indivíduos expostos ao fungo desenvolve infecção assintomática caracterizada pelo teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio

positivo à paracoccidioidina. As formas clínicas da PCM podem ser classificadas em dois grandes grupos: a forma crônica ou adulta (FA) e forma aguda ou juvenil (FJ) (18).

A FA constitui 90% dos casos, atinge preferencialmente indivíduos do sexo masculino acima dos 30 anos e tem instalação lenta e gradual. Acomete principalmente os pulmões, levando ao comprometimento da função pulmonar e formação de granulomas compactos contendo poucas células fúngicas. A doença pode se disseminar para outros órgãos ou tecidos formando lesões secundárias na pele, mucosas, linfonodos e glândulas adrenais. Diferentemente, a FJ atinge crianças e adultos jovens com idade inferior a 30 anos, de ambos os sexos e é caracterizada como uma forma mais grave e disseminada, atingindo o sistema fagocítico-mononuclear com o comprometimento de linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Nestes pacientes os granulomas são geralmente mais frouxos e contém inúmeras células fúngicas (19).

2. A resposta imunológica na paracoccidioidomicose

A resposta imunológica celular caracterizada pela ativação de macrófagos constitui o principal mecanismo de defesa contra o *P. brasiliensis* (7).

Em trabalhos anteriores verificamos que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos moradores da zona endêmica para PCM, que apresentam teste cutâneo positivo a antígeno do fungo, mas não têm sinais ou sintomas da doença (PCM-infecção) proliferam vigorosamente em resposta a antígenos do fungo com produção de IFN- γ e baixas concentrações de IL-4, IL-5 e IL-10, caracterizando uma resposta Th1 (20).

Diferentemente, CMSP de pacientes portadores da FJ apresentam resposta linfoproliferativa basal e teste cutâneo negativo a antígenos do fungo, com a produção de baixas concentrações de IFN- γ e maior secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β (13). Além disso, estes pacientes são caracterizados por eosinofilia periférica e pela produção predominante de anticorpos das classes: IgG4, IgA e

IgE contra gp43 (antígeno imunodominante específico do *P. brasiliensis*), sugerindo uma resposta do tipo Th2 (21,22).

A FA pode ser classificada em 2 tipos, tendo por base o número e a localização das lesões causadas pelo fungo. Nos pacientes com a forma multifocal, na qual as lesões são numerosas e distribuídas em vários órgãos, observa-se um padrão de produção de anticorpos similar ao encontrado na FJ da doença, isto é, com predomínio de IgG4, IgE e IgA, isotipos cujo *switch* é determinado por citocinas Th2. Por outro lado na forma unifocal, caracterizada por lesões restritas a um único órgão, prevalecem anticorpos do tipo IgG1. Quanto à resposta imune celular, pacientes com a FA em geral apresentam resposta linfoproliferativa específica menor do que o grupo PCM-infecção e maior do que o grupo portador da FJ da PCM, com baixa produção de IL-4 e IL-5, níveis equivalentes de IFN- γ e IL-10 e aumento da produção de IL-12 (21,22).

A análise da expressão gênica também mostrou que indivíduos portadores de PCM-infecção apresentam precocemente alta expressão de mRNA para IFN- γ , TNF- α e para as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 (induzidas por IFN- γ e com ação sobre linfócitos T), quando comparados aos pacientes com a forma juvenil da doença. Pacientes com a FA da doença expressam níveis similares de CXCL10 e IFN- γ e altos níveis de CXCL9 em relação aos indivíduos PCM-infecção. Por outro lado, a expressão do mRNA para citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β 1), é elevada e precoce nas formas juvenil e crônica da doença, quando comparado com o grupo PCM-infecção (23).

A análise por meio da citometria de fluxo revelou frequência mais elevada de CMSP positivas IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL9 e CXCL10 em indivíduos portadores de PCM-infecção comparados a pacientes. Neste estudo foi possível verificar células positivas para IFN- γ principalmente na população de linfócitos T CD3⁺CD8⁺, enquanto que as citocinas IL-2 e o TNF- α foram detectados principalmente em linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (24).

Em conjunto estes trabalhos que avaliaram CMSP mostraram claramente uma produção diferencial de citocinas e quimiocinas nas diferentes manifestações

da PCM, com uma resposta Th1 associada à resistência e a resposta Th2 à maior suscetibilidade à doença (17).

Estes resultados também estão de acordo com estudos que avaliaram a resposta imunológica local em lesões da mucosa oral e linfonodos de pacientes com a forma adulta e juvenil da PCM, respectivamente, pela técnica de imunoistoquímica. A expressão do TNF- α e iNOS foi similar em linfonodos e na mucosa oral. Enquanto que a expressão do TGF- β e da IL-10 foi observada principalmente em macrófagos, somente nos linfonodos. A alta expressão de citocinas supressoras (TGF- β e IL-10) nos linfonodos de pacientes com a FJ da PCM apontaram para um mecanismo de evasão do fungo, que poderia contribuir para a disseminação da doença (25).

Além da resposta mediada por linfócito T CD4⁺ foi demonstrado um número aumentado de linfócitos T CD8⁺ no lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes com a FA da PCM, sugerindo um papel para estas células na resposta imune local (26). Em continuidade, estudos *ex vivo* mostraram que pacientes com PCM apresentam uma menor frequência de linfócito T CD8⁺ perforina⁺ e granzima A⁺ e B⁺ no sangue periférico do que indivíduos com PCM-infecção, o que poderia contribuir para uma menor capacidade fungicida/citotóxica dessas células na doença (27).

Em pacientes com PCM, principalmente aqueles com formas mais graves da doença, ocorre uma supressão da resposta imune celular, caracterizada pelo teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio negativo (11), aumento da expressão de CTLA-4 (92) e produção de IL-10 e TGF- β (18). Foi constatado que pacientes com PCM ativa apresentam um número maior de linfócito T com atividade regulatória (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no sangue periférico, do que aqueles que receberam tratamento anti-fúngico e que são considerados curados, sugerindo que estas células estariam desempenhando uma função imunossupressora na fase de atividade da doença (28).

3. A resposta imune inata

Tradicionalmente considerada apenas a primeira linha de defesa, a resposta imune inata tem recebido renovada atenção, tendo em vista a sua capacidade de distinguir estruturas próprias de não próprias e de ativar mecanismos da resposta adaptativa por meio de sinais específicos (29). Apesar da falta de especificidade, quando comparada à resposta adaptativa, a resposta imune inata consegue detectar a presença e a natureza da infecção, iniciando e determinando a resposta efetora da imunidade adquirida. A resposta imune inata baseia-se na pré-existência de alguns elementos: proteínas do sistema complemento, leucócitos polimorfonucleares (PMN), células *natural killer* (NK), células apresentadoras de antígenos (APCs) [macrófagos e células dendríticas (DCs)], citocinas e quimiocinas inflamatórias, que diretamente interagem com microrganismos levando à sua destruição ou inibição de seu crescimento. Estes mecanismos têm um profundo efeito no desenvolvimento da resposta adaptativa, que é ativada em uma fase mais tardia da resposta imunológica (30).

A resposta imune inata contra os fungos baseia-se no reconhecimento de estruturas moleculares conservadas encontradas em inúmeros grupos de microrganismos, os PAMPS (padrões moleculares associados à patógenos), que são reconhecidos pelos PRRs (receptores de reconhecimento padrão), como os receptores de manose (MRs), receptores de complemento (CRs), receptores de glucanas (dectina-1) e os receptores do tipo *toll* (TLRs), capazes de iniciar a fagocitose e ativar a via pro-inflamatória (31).

Os TLRs constituem um dos grupos mais importantes de proteínas transmembrana capazes de interagir com patógenos. No mínimo 11 membros desta família foram descritos em humanos (32). A ativação dos TLRs resulta na produção de vários mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios que regulam a resposta imune adaptativa (16,31). Recentemente foi descrito que os TLRs podem ser utilizados pelo *P. brasiliensis* como mecanismo de escape dos fatores fungicidas e fungistáticos da imunidade inata (26).

O TLR4 reconhece lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (LPS) enquanto que o TLR2 está envolvido na interação com lipoproteínas de bactérias gram-positivas, peptidoglicanos e componentes de parede celular de fungos (30,31). Estudos posteriores também atribuíram ao TLR2 a indução de uma resposta imune anti-inflamatória no hospedeiro (33).

Os receptores do tipo *toll* controlam a expressão gênica de citocinas inflamatórias (IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em DCs por meio de vias de sinalização NF- κ B, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores reguladores de interferons (IRFs) (34). A ativação de DCs por meio do TLR4 e TLR9 (LPS e CpG, respectivamente) leva a rápida produção de IL-6, suprimindo a atividade de LT CD4⁺CD25⁺ (35,36).

Células leveduriformes do *P. brasiliensis* são capazes de ativar TLR2 e TLR4 de macrófagos, causando o aumento da sua atividade fagocítica e produção de óxido nítrico (37). Em trabalho complementar os mesmos autores observaram que camundongos TLR2^{-/-} com infecção pulmonar crônica pelo *P. brasiliensis* apresentam uma doença mais controlada e menos grave que animais selvagens, com diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados, aumento do número de neutrófilos, diminuição da produção de citocinas Th1 e Th2 e produção de TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-17. Nestes animais o desenvolvimento preferencial de uma resposta Th17 foi associado a uma expansão diminuída de linfócito Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e maior controle da doença (38). Por outro lado, em outro trabalho os mesmos autores verificaram que camundongos C3H/HeJ, que são naturalmente deficientes na via de sinalização do TLR4, não são capazes de controlar a infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*, o que estaria associado a uma resposta imune celular deficiente e aumento da população de linfócito T regulatórias, comparado a animais C3H/HePas que expressam receptores funcionais (39).

Resultados de nosso grupo de pesquisa sugerem a participação do TLR2, TLR4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização do fungo por monócitos e neutrófilos humanos, e consequente ativação da resposta imunológica ao

Paracoccidioides brasiliensis. Neste trabalho foi demonstrado que células leveduriformes da cepa Pb265 (baixa virulência) induzem um balanço na produção TNF- α /IL-10, o que poderia possibilitar melhor controle da infecção pelo hospedeiro, evitando uma resposta inflamatória exacerbada (16). Por outro lado, Acorsi-Valerio *et. al.*, (2010) mostraram que a ativação de neutrófilos humanos por células leveduriformes da cepa de alta virulência (Pb18) via TLR2 e TLR4 induzia a produção de IL-8 e IL-10, o que poderia ser considerado um mecanismo patogênico durante a infecção (40).

O reconhecimento de polissacarídeos da parede dos fungos inicia respostas imediatas como fagocitose, produção de compostos antimicrobianos e indução de citocinas inflamatórias, que ativam e recrutam células do sistema imune inato e adaptativo. A dectina-1, receptor tipo lectina C, reconhece moléculas de 1,3 β -glucanas, um dos principais componentes da parede celular de fungos patogênicos como *P. brasiliensis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Pneumocystis jirovecii*. A interação da dectina-1 com seu ligante induz a fagocitose, produção de citocinas (TNF- α , IL-2, IL-10 e IL-12), produção de reativos intermediários do oxigênio e recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório para controle da proliferação fúngica (41,42).

Alguns trabalhos sugerem que a dectina-1 age em sinergismo com TLRs, promovendo uma exacerbada resposta inflamatória (43). Camundongos deficientes em dectina-1 são mais suscetíveis à infecção por *Candida albicans* e *Pneumocystis jirovecii* (41).

Além do reconhecimento de 1,3 β -glucanas, outros trabalhos mostraram que, em humanos, a dectina-1 pode funcionar como uma molécula co-estimulatória para linfócito T (44). Os receptores do tipo *toll* induzem uma resposta Th1; enquanto que dectina-1 pode levar a produção de IL-23 e IL-6 polarizando para a resposta do tipo Th17 (31)

4. Células Dendríticas (DCs)

Vários tipos de células podem exercer a função de apresentação de antígenos (APCs) como macrófagos, monócitos, linfócitos B, DCs e células endoteliais. (45). Entretanto apenas as DCs são consideradas APCs profissionais, pois são fundamentais para manter a tolerância aos antígenos *self*, para ativar as linfócito T *naive*, efectoras e memória e para interagir com células do sistema imune inato, potencializando assim a resposta imune adaptativa (46-48). As DCs são heterogêneas e diferem em relação aos seus marcadores de superfície, localização e produção de citocinas. Diferentes fatores de transcrição e citocinas controlam o desenvolvimento de populações de DCs com distintas propriedades funcionais (49). Desta forma as DCs mantêm a homeostasia entre as subclasses de linfócitos T *naive* CD4⁺ e CD8⁺ (50).

As DCs podem ser de origem mielóide (mDCs) ou plasmocitóide (pDCs). As pDCs estão envolvidas na imunidade anti-viral, expressam TLR7 e TLR9 e produzem grandes quantidades de IFN do tipo I (34,51,52).

Em humanos, DCs mielóides podem ser produzidas *in vitro* a partir de monócitos CD14⁺ do sangue periférico que representam 10% dos leucócitos circulantes (53). Os monócitos são células imunes efectoras equipadas com receptores para quimiocinas, e que possuem a capacidade de migrar do sangue periférico para os tecidos durante os processos infecciosos. Estas células fagocíticas produzem citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , CXCL8, IL-6), anti-inflamatórias (IL-10), se diferenciam em macrófagos e DCs, durante os processos inflamatórios e são fundamentais na resposta imune inata a microrganismos patogênicos (47,53).

Monócitos CD14⁺ diferenciam-se em DCs *in vitro* na presença de GM-CSF e IL-4. O GM-CSF é um fator de crescimento que promove a sobrevivência e diferenciação de monócitos em DCs funcionais, enquanto que a IL-4 inibe a diferenciação de monócitos em macrófagos (54). A combinação destas citocinas para a obtenção de DCs com fenótipo imaturo a partir da diferenciação de monócitos foi descrita por vários autores (55-58). Estas células mielóides

diferenciadas na presença de GM-CSF produzem grandes concentrações de TNF- α e óxido nítrico após estimulação com microrganismos patogênicos (59).

Na periferia, as DCs imaturas (iDCs) agem como sentinelas do sistema imune e são encontradas em tecidos não linfáticos como epitélio (células de *Langerhans*), trato respiratório e gastrointestinal (60). Durante o processo infeccioso *in vivo*, iDCs da periferia são ativadas pela interação com componentes dos microrganismos como lipopolissacarídeos (LPS) ou mediadores inflamatórios (IL-1 β /TNF- α) da resposta imune inata, capturam e processam antígenos e adquirem receptores de quimiocinas (CCR5/CCR7) que lhes permitem migrar para os linfonodos, via linfático aferente, onde ocorre a sua maturação e início da resposta imune, com a apresentação de peptídeos para linfócitos T *naive* (45,46). O direcionamento da migração de DCs depende da indução da expressão do receptor CCR7, ligante das quimiocinas CCL19 e CCL21. O CCL21 é produzido em órgãos linfóides secundários por células reticulares fibroblásticas em áreas ricas em LT. Em nódulos linfóides não inflamados as células reticulares fibroblásticas produzem CCL19. Em humanos o CCL19 pode ser produzido por DCs CCR7⁺ ativadas, que migram para os nódulos linfóides em condições inflamatórias (61). A expressão deste marcador é uma das características chave das DCs maduras e *steady-state* (estágio intermediário de ativação) e as difere de outras APCs como os macrófagos (50). Durante o processo de maturação a expressão de CCR7 aumenta em até 10 vezes, induzindo a migração das DCs para os linfonodos (62).

Outro receptor expresso em iDCs, macrófagos e linfócitos T de memória e efetores é o receptor de quimiocina CCR5, que tem alta afinidade pelo CCL3/MIP-1 α (63). O CCR5 liga-se também à proteína de choque térmico 70 de bactérias (HSP70) (64).

A estimulação de monócitos com GM-CSF e IL-4 *in vitro* leva a sua diferenciação em DCs com fenótipo imaturo, que expressam altos níveis de CD11c, CD1a, baixa expressão de moléculas de adesão (LFA-1/CD11a, ICAM-1/CD54, LFA-3/CD58), antígenos do complexo principal de histocompatibilidade

classe II (HLA-II) e moléculas de coestimulação (CD40, B7-1/CD80, B7-2/CD86). Essas células não expressam CD14/CD16, nem CD83 (marcador de DCs após maturação) e são especializadas na captura e processamento de antígenos. A estimulação *in vitro* das iDCs com TNF- α , CD40L e LPS pode levar a sua maturação (46,65,66).

A maior característica funcional das iDCs é a sua alta capacidade de fagocitose. A macropinocitose refere-se à formação de vesículas endocíticas primárias (tamanho entre 1-3 μ m). O TNF- α e produtos bacterianos (como LPS) estimulam a macropinocitose (67,68). A endocitose de antígenos é uma importante função de iDCs, que para tal, expressam uma grande variedade de receptores como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), Fc ϵ RI, Fc ϵ RII (CD23) e Fc α RIII (CD89) (34,69).

As DCs também expressam receptores de lectina do tipo C (CLRs) responsáveis pelo reconhecimento de estruturas de carboidratos em patógenos, como os receptores de manose de macrófagos (MR/CD206), DEC-205/CD205, DC-SIGN/CD209, BCDA-2, dectina-1, DCIR, DCAL-1 e C-LEC (70-73). Estas também expressam receptores *scavenger* classe A (SR-A), CD36 e LOX-1 (74).

A fagocitose de material apoptótico também é uma característica das iDCs por meio de outros receptores como as integrinas α v β 3 e α v β 5 e o receptor *scavenger* CD36. A fagocitose destes antígenos induz *in vivo* uma resposta imune efetiva (linfócitos T CD4⁺) ou a produção de linfócito T regulatórias (Treg) (75). Alguns trabalhos revelam que nem todos os antígenos que são fagocitados pelas iDCs são processados em peptídeos e a fração antigênica pode ser apresentada na sua forma nativa (50).

Alguns estudos revelam que a fagocitose de microrganismos opsonizados envolve os receptores de complemento e receptores do tipo Fc, enquanto que a fagocitose de microrganismos não opsonizados envolve receptores MR e o CD36 (34).

A maioria das DCs residentes periféricas expressam fenótipo imaturo. Se não houver estimulação destas células na periferia elas permanecem imaturas e residentes no tecido com baixa expressão das moléculas HLA-II e ausência de moléculas de coestimulação. A apresentação de antígenos na ausência de moléculas co-estimulatórias leva à expansão clonal de linfócitos T anérgicos (75).

A maturação completa das DCs é necessária para que haja a indução da resposta imune, com ativação de LT *naive*. A maturação completa destas células pode ser induzida por meio dos receptores tipo *toll* (TLRs), LPS, citocinas inflamatórias, RNA viral, ou CD40L. Em média o processo de maturação de DCs é rápido (\cong 18 a 20 horas, com a estimulação pelo LPS), antes da sua morte por apoptose (76).

Trabalhos experimentais demonstraram que maturação *in vitro* de DCs pelo TNF- α induz a ativação de Treg produtoras de IL-10, enquanto que a maturação destas células pelo LPS e CD40L induz a polarização de linfócitos Th1. *In vitro* DCs maturadas pelo CD40L produzem grandes quantidades de IL-12 e induzem a secreção de IFN- γ por LT CD4⁺ *naive* em cultura alogênica. A IL-12 suprime a expressão do fator de transcrição GATA-3, prevenindo o desenvolvimento de linfócito Th2. Já o LPS induz a expressão das moléculas de coestimulação (B7-1/CD80 e B7-2/CD86) e a produção de IL-6 e TNF- α por DCs. Por outro lado as DCs estimuladas *in vitro* com TGF- β induzem a proliferação de linfócito Treg CD4⁺Foxp3⁺ a partir de linfócitos T *naive*. Portanto, dependendo do estímulo que causa a diferenciação das DCs o resultado pode ser a indução de células com fenótipo imunogênico ou tolerante (Treg), que vão determinar a resposta imune subsequente (50,60,75,77-79).

Além da diferenciação Th1 e Th2, DCs podem induzir a diferenciação de linfócito Th17 a partir de LT *naive* na presença de citocinas como: IL-6, IL-1 β e IL-23. Estas células produtoras de IL-17, IL-17F, IL-22 e IL-21 estão envolvidas em processos inflamatórios exacerbados como doenças autoimunes e na proteção contra vários microrganismos patogênicos como: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (60). O fator de transcrição

ROR γ t e ROR α são induzidos durante a diferenciação de LT *naive* para linfócito Th17 em resposta a IL-6 (via STAT3), IL-21 e IL-23 (80,81).

O balanço entre a expressão do ROR γ t e do Foxp3 determina a diferenciação de LT *naive* em linfócito Th17 ou Treg. O Foxp3 é altamente induzido pelo TGF- β e expresso em linfócito Treg CD4⁺CD25⁺. Por outro lado a IL-6 e a IL-21 inibem a indução do Foxp3 pelo TGF- β e ativam a expressão de ROR γ t e ROR α favorecendo a diferenciação de linfócito Th17 (81,82).

Além da função imunogênica as DCs exercem a função tolerogênica que pode ser influenciada pela presença no microambiente de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e moléculas co-estimulatórias (B7-1/CD80 e B7-2/CD86). Entretanto, citocinas inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) induzem a expressão da enzimaIDO (indoleamina 2,3-dioxygenase) em DCs, o que limita a ativação excessiva de LT no sítio inflamatório (60). A IDO é uma enzima citosólica que catalisa a etapa inicial do metabolismo do aminoácido essencial triptofano (Trp) pela via das quinureninas, que por sua vez, inibe a imunidade mediada por linfócitos T. Esta inibição pode ser devido ao catabolismo do Trp, indução de apoptose dos LT via quinureninas, geração de linfócito Treg e inibição da diferenciação de linfócitos Th17 (83).

Estudos experimentais recentes mostraram que o número de DCs correlaciona-se inversamente com o número de Treg, sugerindo que DCs tolerogênicas mantêm o balanço entre imunidade e tolerância (60).

5. DCs na PCM experimental

Vários trabalhos recentes evidenciaram a importante participação das DCs na infecção experimental pelo *P. brasiliensis*.

Foi demonstrado que DCs de camundongos resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis* apresentam alta expressão de antígenos HLA-II, CD80 e CD86, quando comparado com macrófagos e linfócitos B e são capazes de estimular a produção de citocinas do tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ). Já os macrófagos estimulam a produção de citocinas Th1 e Th2 (IL-10, IL-4 e IFN- γ), enquanto os linfócitos B induzem somente citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) (84). Em contrapartida, em animais suscetíveis foi observado que macrófagos e DCs, não induzem a proliferação de linfócitos Th1 e nem tampouco a produção de citocinas, o que poderia levar à progressão da doença (85).

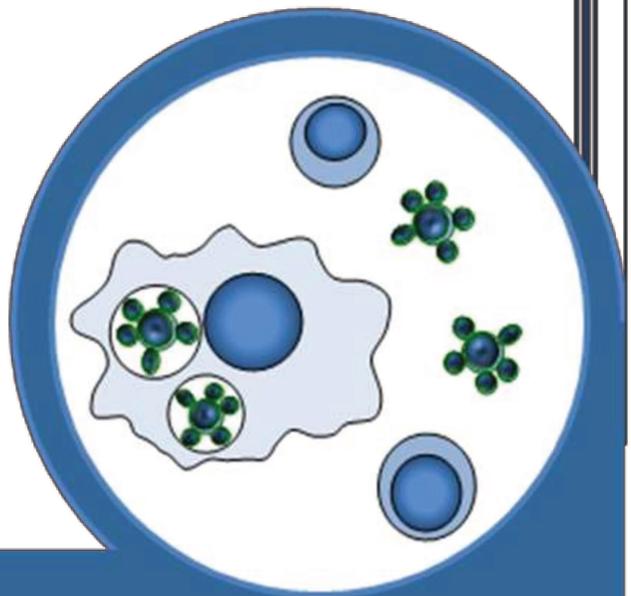
Em trabalho complementar os mesmos autores demonstraram que células da medula óssea de camundongos resistentes (A/J), estimuladas *in vitro* com citocinas durante 7 dias e pulsadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* ou com gp43 (com ou sem LPS) expressam baixas concentrações de antígenos HLA-II e moléculas de adesão e produzem baixas concentrações de IL-12 e TNF- α . Esta supressão da resposta imune inata foi interpretada como uma estratégia do fungo para persistir no hospedeiro, sugerindo que as células leveduriformes em si ou a gp43 liberada em grande quantidade durante a infecção poderiam resultar na redução da eficácia da resposta imunológica de pacientes com PCM (86). Além disso, foi verificado que a baixa expressão das moléculas co-estimulatórias e a baixa produção de IL-12 por DCs estimuladas pela gp43 induzem uma resposta Th1 deficiente, com um aumento do número das unidades formadoras de colônias (CFUs) do fungo nos pulmões (87).

Na mesma linha outros estudos mostraram que em animais suscetíveis (B10.A) a infecção pelo *P. brasiliensis* induz DCs com fenótipo regulatório capazes de produzir grandes quantidades de IL-10 e pouca IL-12 e que estas DCs regulatórias são induzidas via TLR2 e dectina-1 (88).

Estes estudos demonstram o importante papel nas DCs no controle da resposta imune na PCM experimental e sua influência na suscetibilidade ou resistência à doença. Entretanto, não existem trabalhos que avaliaram a participação das DCs na infecção humana pelo *P. brasiliensis*.

Para preencher esta lacuna o presente trabalho objetivou caracterizar as DCs geradas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com PCM estimuladas *in vitro* por células leveduriformes de *P. brasiliensis* das cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência). Em uma segunda etapa, DCs pulsadas células leveduriformes do fungo foram analisadas quanto à capacidade de ativar linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ autólogos.

Objetivos



1. Objetivo geral:

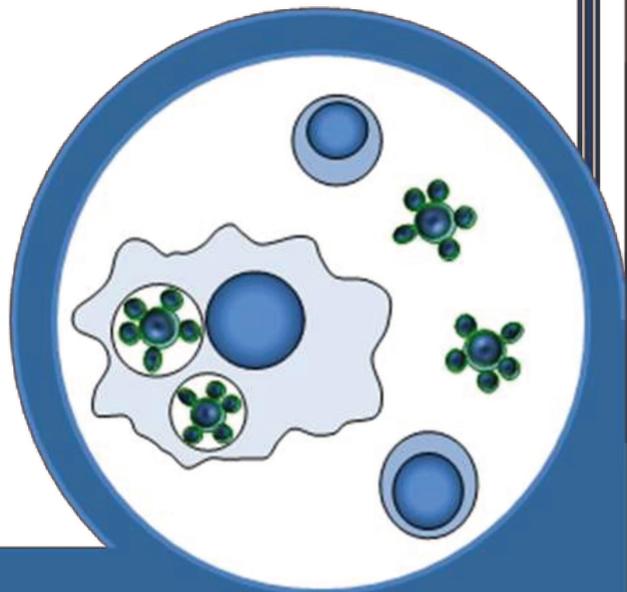
Verificar o potencial de células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* (Pb18, alta virulência e Pb265, baixa virulência) em promover a diferenciação fenotípica e funcional de DCs obtidas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com a forma adulta (FA) e com a forma juvenil (FJ) da PCM.

2. Objetivos específicos:

1. Verificar se monócitos do sangue periférico de pacientes com a FA e FJ da PCM e indivíduos normais saudáveis (controles) podem ser diferenciados *in vitro* em DCs competentes pela estimulação com células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* e se existe diferença entre as cepas Pb18 (alta virulência) ou Pb265 (baixa virulência)

2. Verificar se DCs fenotipicamente competentes geradas a partir de MSP de indivíduos normais saudáveis e de pacientes (FA e FJ) com PCM são capazes ativar linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos (proliferação, produção citocinas e indução de células com fenótipo regulatório)

Material e Métodos



1. Casuística

Foram incluídos no estudo 27 pacientes com PCM, atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP, com diagnóstico comprovado pelo achado do fungo em exame direto ou biópsia. Os pacientes foram agrupados de acordo com a forma clínica em 2 grupos: forma adulta (FA: n=15, 13 do sexo masculino e 2 do sexo feminino) e forma juvenil (FJ: n=12, 5 do sexo masculino e 7 do sexo feminino). As características clínicas dos pacientes estão descritas no anexo 1 e 2. Também foram estudados 16 indivíduos saudáveis [grupo controle (C), 9 do sexo masculino e 7 do sexo feminino] selecionados na zona endêmica de Campinas, SP, que não entraram em contato com o fungo, evidenciado por teste cutâneo negativo à gp43 de *P. brasiliensis*.

Os indivíduos foram submetidos a 2 coletas de sangue (entre 40mL e 100 mL cada), com intervalo de 1 semana.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e aprovado segundo o Parecer nº 263/2006 e CAAE: 0195.0.146.000-06 (anexo 3) e todos os sujeitos aceitaram participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 4).

2. Obtenção de células leveduriformes do *P. brasiliensis*

Células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* (cepa Pb18 alta virulência e cepa Pb265 baixa virulência) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Vera Calich do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), e desde então são mantidas em cultura a 35°C no Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, em meio Neopeptona suplementado com aminoácidos. As células leveduriformes foram utilizadas no quinto dia após repique. Foram utilizadas somente as células leveduriformes que apresentaram viabilidade acima de 80%, avaliada pela coloração com Azul de Trypan. Para a estimulação das DCs foram utilizadas células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 na concentração de 1:10 (levedura: células dendríticas) (87).

3. Obtenção do antígeno celular do *P. brasiliensis* (cAg)

Células leveduriformes (cepa Pb18 alta virulência e Pb265 baixa virulência) obtidas após 5 dias de crescimento em meio Fava-Neto, foram homogeneizadas por 1 minuto em banho de gelo, sonicadas em 3 ciclos de 1 minuto e incubadas por uma noite a 4°C, sob agitação lenta e contínua. A mistura foi então centrifugada a 10.000 r.p.m. por 30 segundos a 4°C. O sobrenadante obtido foi dialisado por 24 horas em tampão Tris-HCl 0.002M (pH 8.1) com 2 trocas e a preparação obtida (cAg) foi avaliada quanto ao conteúdo protéico pelo método de Bradford e caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração prata.

4. Separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Todas as culturas celulares foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular (LIC) do Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância (CIPOI), UNICAMP.

Aproximadamente um volume entre 40mL e 100mL de sangue periférico foram coletados em tubos com heparina. As CMSP foram isoladas em gradiente de separação Ficoll-Hypaque, densidade 1,077 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (89). Após 3 lavagens em solução tampão fosfato gelado (PBS) (Sigma) as células foram colocadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 2% de soro fetal bovino (Invitrogen, Paisley, Escócia), penicilina e estreptomicina (PS – 0,2%) (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). Posteriormente as células foram contadas em câmara de Neubauer e a sua concentração ajustada para 5 a 10×10^6 células/mL.

No anexo 5 pode ser verificado o volume de sangue periférico coletado, o número de células obtidas após a separação em *Ficoll Hypaque*, a fração de células obtidas após aderência em plástico, a recuperação e a porcentagem de iDCs após 7 dias de cultura com GM-CSF e IL-4 em relação a fração aderente inicial.

5. Geração de células dendríticas (DCs)

As DCs foram produzidas *in vitro* a partir de CMSP de acordo com Sallusto e Lazavecchia (56). Resumidamente, CMSPs (5 a 10×10^6 células/mL) foram incubadas em frascos plásticos de 75cm^2 (Sarstedt, Montreal, Québec, Canada) por 2 horas em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida as células não aderentes foram delicadamente removidas. Após a remoção das células não aderentes a fração de células aderentes (monócitos) foi delicadamente submetida a 5 lavagens com D-PBS (Sigma) aquecido em banho-maria a 37°C . Em seguida esta fração celular foi incubada durante 7 dias com RPMI suplementado com 10% SFB, 1% Piruvato (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 2% L-glutamina (GIBCO), rhIL-4 recombinante (rhIL-4) (5ng/mL ou 500 UI/mL) (R&D Systems inc., Minneapolis, EUA) e rhGM-CSF (100ng/mL ou 800 UI/mL) (Peptotech-Funpec, Ribeirão Preto, SP, Brasil). No 2° e 5° dia as culturas receberam citocinas frescas (GM-CSF e IL-4), sem a troca do meio de cultura inicial (90,91). Para acompanhar a avaliação do processo de diferenciação de monócitos em DCs foi realizada uma marcação de superfície das células nos seguintes tempos: zero, 2° e 7° dia (Fig. 1 do anexo 6).

6. Maturação de DCs

No 7° dia de cultura as células dendríticas imaturas (iDCs) foram removidas do frasco com ajuda de D-PBS gelado e de um bastão de borracha (Corning, New York, EUA). As células foram lavadas com PBS e a viabilidade foi avaliada pela coloração com azul de Trypan (91). Estas células foram avaliadas em todos os experimentos como 7° dia SE (sem estímulo) (condição 1).

Em seguida, parte das células foi colocada em tubos com RPMI 1640 suplementado com IL-4 (5ng/ml ou 500 UI/ml), GM-CSF (100ng/ml ou 800 UI/ml) e incubadas por 18h, sob agitação constante, a 37°C , em estufa com 5% de CO_2 , na presença ou não dos seguintes estímulos: células leveduriformes de *P. brasiliensis* cepa Pb18 ou Pb265 ou CD40L (controle positivo).

Em resumo, em todos os experimentos foram avaliadas DCs geradas nas seguintes condições:

Condição 1: DCs (7º dia) + meio + IL-4 + GM-CSF → sem estímulo (SE)

Condição 2: DCs (8º dia) + meio + IL-4 + GM-CSF → sem estímulo (SE)

Condição 3: DCs (8º dia) + meio + IL-4 + GM-CSF + células leveduriformes Pb18

Condição 4: DCs (8º dia) + meio + IL-4 + GM-CSF + células leveduriformes Pb265

Condição 5: DCs (8º dia) + meio + IL-4 + GM-CSF + CD40L → controle positivo

7. Caracterização fenotípica das DCs

Parte das células recolhidas no 7º e no 8º dia de cultura foram lavadas e colocadas em PBS suplementado com soro albumina bovina ou soro AB humano a 0,5% (BSA) (Gibco) e azida sódica 0,2% (Labsynth Ltda, SP, Brasil) e distribuídas em tubos de poliestireno (concentração entre 1×10^5 a 2×10^5 células/tubo), para a pesquisa de marcadores de superfície celular. A reação de imunofluorescência direta foi processada, incubando-se as células com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos durante 20 minutos (PharMingen San Diego, CA, USA). As incubações foram feitas protegidas da luz e intercaladas com lavagens com tampão PBS-BSA ou PBS-SAB. No final, as células foram fixadas com paraformaldeído a 0,5% (Labsynth Ltda, SP, Brasil) e analisadas em citômetro de fluxo (FACsCAnto Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA). No mínimo 5.000 a 10.000 eventos foram adquiridos em cada teste e os dados foram processados utilizando o programa DIVA (Becton Dickinson, EUA). Como controles negativos foram utilizadas células sem nenhuma marcação e imunoglobulinas de camundongos dos mesmos isotipos dos anticorpos monoclonais, para estabelecer o *background* de fluorescência (IgG1, IgG2a, IgG2b). Os anticorpos utilizados para marcação das células no 7º e 8º dia, bem como as células não aderentes (linfócitos) obtidas conforme descrição abaixo (item 10), estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos empregados na caracterização fenotípica das DCs e das células não aderentes (linfócitos)

Anticorpo	Fluorocromo	Procedência
Anti-CD83	PE	PharMingen
Anti-CD80	PE	PharMingen
Anti-CD86	FITC	PharMingen
Anti-CD1a	PE	PharMingen
Anti-HLA classe I	PECy5	PharMingen
Anti-HLA classe II	FITC	PharMingen
Anti-CCR7	PE	PharMingen
Anti-CD209	APC	PharMingen
Anti-TLR2	FITC	PharMingen
Anti-TLR4	PE	PharMingen
Anti-Dectina-1	PE	PharMingen
Anti-CD4	FITC ou APC	Caltag
Anti-CD8	PECy5	Caltag
Anti-CD25	PECy5	Caltag
Anti-CD45RA	FITC	PharMingen
Anti-CD45RO	PE	PharMingen
Anti-CD69	PE	PharMingen
Anti-Foxp3	PE	PharMingen
Anti-IL2	PE	Caltag
Anti-IL-17	PE	Caltag
Anti-IL-10	PE	Caltag
Anti-IFN- γ	FITC	Caltag

8. Avaliação da capacidade de fagocitose

As células obtidas no 7º e 8º dia de cultura foram avaliadas quanto a capacidade de fagocitose de partículas de DEXTRAN-40 (40 kDa, Sigma) conjugadas com FITC. Para este experimento foram utilizadas células apenas do grupo controle (C).

As células (1×10^5 /tubo) foram colocadas em 200µL de PBS suplementado com 5% de soro AB humano (PBS-SAB) e incubadas em estufa com 5% de CO₂ por 15 minutos. Após este período adicionou-se em cada tubo 1mg/mL de partículas de DEXTRAN-40 e incubou-se novamente em estufa por 30 minutos, quando então a reação foi interrompida pela adição de PBS-SAB contendo 0,1% de azida sódica, seguido de 3 lavagens com a mesma solução. Após a última lavagem as células foram fixadas com paraformaldeído (0,5%) e analisadas em citômetro de fluxo (92).

Em outro experimento as células foram incubadas durante 2 horas com células leveduriformes ($0,2 \times 10^6$) do fungo *P. brasiliensis* (Pb265) marcados com CFSE (*Carboxy-fluorescein succinimidyl ester* 1,5µM/mL – Sigma Aldrich), durante 5 minutos, na concentração de 1:1 (DCs:células leveduriformes). Após este período foram feitas lâminas de citospin, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico.

Em um terceiro tipo de experimento para a verificação da capacidade de fagocitose as células no 7º dia foram incubadas com células leveduriformes do fungo, anteriormente marcadas com CFSE na proporção de 1:1, por 18 horas em estufa com 5% de CO₂. Após este período as células foram submetidas à lavagem com PBS e marcadas com anti-CD83 PE (item 9) e com DAPI (4'-diamidino - 2 - phenylindole), corante específico para DNA. Posteriormente foram feitas lâminas de citospin fixadas com paraformaldeído 2%, durante 20 minutos, analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon, EUA) (93).

9. Expressão gênica de citocinas e dectina-1 por DCs

9.1.- Extração do RNA total e síntese de cDNA.

O RNA total de parte (2×10^6 células) das células no 7º dia de cultura e no 8º dia (após diferentes estímulos) foi extraído utilizando-se o reagente *Trizol* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop –Thermo Scientific, EUA) com leituras a 260 e 280 nm. As amostras de RNA foram então tratadas para a remoção de DNA genômico. Para tanto, 1µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,7µL e foram acrescentados 3,97µL do mix contendo 2,97µL de tampão 10x concentrado e 1µL de DNase (Ambion, Austin, EUA). Então foi adicionado 0,3µL de EDTA pH 8.0 - 0,5M e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 75°C para remoção da atividade enzimática da DNase. Para a síntese do cDNA, ao RNA tratado foi adicionado 1µL de oligo dT₁₂₋₁₈ e 1µL de *primers* randômicos (Applied Biosystems, California, EUA). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada rapidamente em gelo. A seguir foram adicionados 18µL de um *mix* composto por: 10 µL de tampão de síntese; 2,5 µL de dNTP (10mM); 5 µL de DTT (0,1M) e 0,5 µL de superscript R/T II (200U/µL - (Invitrogen)). A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, e a seguir a 40°C por 50 minutos. A atividade enzimática foi removida incubando-se a 90°C por 5 min, seguido por incubação a 4°C por 5 min. A mistura foi centrifugada rapidamente, adicionando-se 1 µL de RNase humana, incubando-se a 37°C por 20 minutos, para a remoção das moléculas restantes de RNA. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

9.2.- q-RT-PCR

A reação de q-RT-PCR foi realizada em equipamento de análise em tempo real (StepOne, Applied Biosystems) utilizando metodologia com corante intercalante Sybr Green. Em cavidades de placas de 100µL foram adicionados 3 µL de cDNA (ou de água no caso do controle negativo), 1 µL do primer sense e 1 µL do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 80 pM (previamente titulados) e 5 µL do master mix, contendo dNTP, Taq polimerase,

MgCl₂, Sybr Green, e tampão (Absolute SYBR Green RT-PCR mix, Applied Biosystems). As amostras foram colocadas no equipamento de PCR em tempo real e submetidas a 40 ciclos de amplificação: 95°C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Para avaliar a especificidade dos primers utilizados, em cada reação foi elaborada uma curva de *melting* (aquecimento gradual da amostra amplificada de 60° C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual é possível observar a formação de apenas um tipo de *amplicon*. Os resultados obtidos foram normalizados utilizando-se o gene de referência YWHAZ e expressos como concentração relativa obtida pelo cálculo do $\Delta\Delta$ CT de cada amostra. A sequência de primers utilizados está listada na tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados nas reações de q-RT-PCR

Primer	Sequência (5' - 3')
YWHAZ	Sense – ACT TTT GGT ACA TTG TGG CTT CAA Anti-sense – CCG CCA GGA CAA ACC AGT AT
IL-6	Sense – GGT ACA TCC TCG ACG GCA TCT Anti-sense – GTG CCT CTT TGC TGC TTT CAC
IL-1 β	Sense – CAC GAT GCA CCT GTA CGA TCA Anti-sense – AGA CAT CAC CAA GCT TTT TTG CT
TNF- α	Sense – TGG CCC AGG CAG TCA GA Anti-sense – GGT TTG CTA CAA CAT GGG CTA CA
IL-12p35	Sense – CCT GGA CCA CCT CAG TTT GG Anti-sense – TGA AGG CAT GGG AAC ATT CC
IL-12p40	Sense – TCA TCA GGG ACA TCA TCA AAC C Anti-sense – CAC CTG CCG AGA ATT CTT TAA TG
IL-23p19	Sense – CTC AGT GCC AGC AGC TTT CAC Anti-sense – TCT CTT AGA TCC ATG TGT CCC ACT AG
IL-10	Sense – GGC CAG GGC ACC CAG TCT Anti-sense – TCG AAG CAT GTT AGG CAG GTT
TGF- β	Sense – TGA GGG CTT TCG CCT TAG C Anti-sense – CGG TAG TGA ACC CGT TGA TGT
TLR2	Sense – ATT GTG CCC ATT GCT CTT TC Anti-sense – CTT CCT TGG AGA GGC TGA TG
TLR4	Sense – TCC ATA AAA GCC GAA AGG TG Anti-sense – GAT ACC AGC ACG ACT GCT CA
Dectina-1	Sense – AAG GAT CGT GTG CTG CAT CTC Anti-sense – CAC CAG TAT TAC CAA GCA TAG GAT TC

10. Separação de células não aderentes

No 8º dia da cultura de DCs os indivíduos controle e pacientes (FA e FJ) foram convocados para nova coleta de sangue. Após a separação em gradiente de Ficoll Hypaque as CMSPs (5 a 10×10^6 células/mL) foram incubadas em frascos plásticos de 75cm^2 (Sarstedt) por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . A fração aderente foi descartada e as células não aderentes (linfócitos) foram removidas e utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

11. Proliferação de linfócitos T autólogos induzida por DCs

DCs no 8º dia (2×10^4 células/orifício) obtidas após a estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), CD40L 10% ou apenas meio (SE) foram distribuídas em placas de 96 orifícios, fundo redondo (Corning) e co-cultivadas com células não aderentes autólogas (2×10^5 células/orifício) (94).

Antes da incubação a fração não aderente foi marcada com CFSE. O CFSE se liga espontaneamente e irreversivelmente a proteínas intracelulares e de superfície pela reação com as cadeias laterais de lisina e outros grupos amina. Quando a célula se divide, a marcação com CFSE é distribuída igualmente entre as células filhas, que estarão então com metade da fluorescência das células-mãe. Como consequência a divisão pela metade da intensidade de fluorescência marca cada geração sucessiva em uma população de células em proliferação e pode ser seguida por citometria de fluxo (figura 1). Para a marcação, 1×10^7 células não aderentes foram colocadas em 1 mL de PBS estéril seguido da adição de CFSE ($1,5\mu\text{M}/\text{mL}$). A suspensão foi incubada 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro AB. As células foram então submetidas a 2 lavagens consecutivas com PBS-SAB. Após as lavagens as células foram contadas, ajustadas para 2×10^5 células/orifício e adicionadas sobre as DCs previamente distribuídas na placa. Em seguida foram estimuladas com o cAg de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265 - $10\mu\text{g}/\text{mL}$). Como controle positivo foi utilizado o mitógeno Concanavalina A (ConA - $50\mu\text{g}/\text{mL}$ - Sigma). Após 7 dias

de incubação a proliferação celular foi avaliada de acordo com a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE obtido em cada amostra, com a marcação dos linfócitos com anti-CD4 PE-Cy5 e anti-CD8 PE.

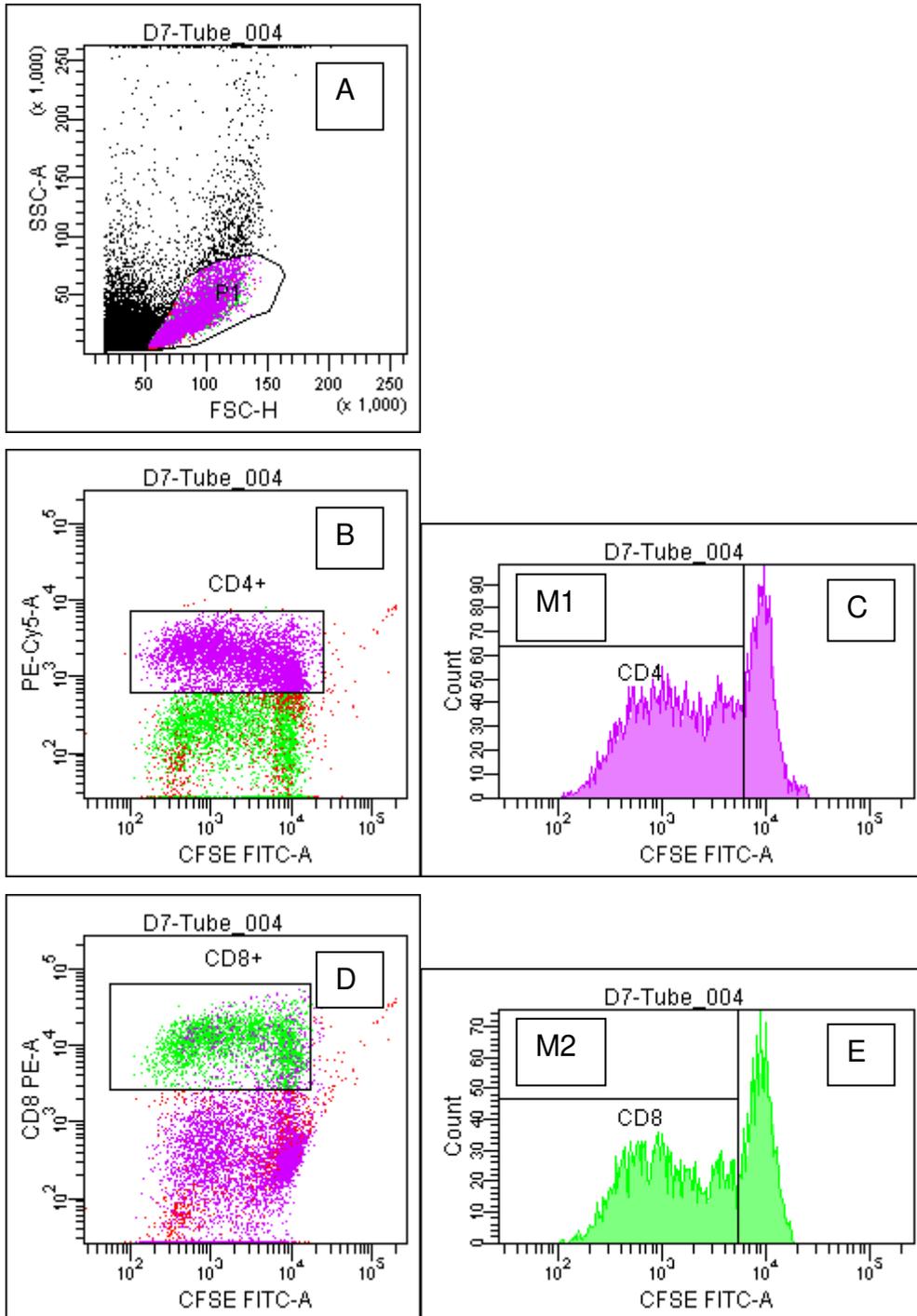


Figura 1 (acima): Estratégia utilizada para analisar a proliferação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos marcados com CFSE após 7 dias de co-cultura com DCs. A região de linfócitos (em repouso ou blastos - em rosa em **A**) foi determinada pela sua distribuição quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) (**A**). A partir desse gráfico foi gerado um outro “dot-plot” (**B** e **D** respectivamente) com a análise das fluorescências (anti-CD4 – PECy5/CFSE e anti-CD8 – PE/CFSE, respectivamente), no qual as populações de células T CD4⁺ (em rosa) e T CD8⁺ (em verde) foram selecionadas pela delimitação de outras regiões. Por meio da combinação das regiões de linfócitos e das células T CD4⁺ ou T CD8⁺ foram gerados histogramas (**C** e **E**, respectivamente) nos quais foram analisadas as porcentagens de células em proliferação (M1 e M2).

12. Caracterização fenotípica e expressão de citocinas por linfócitos estimulados por DCs

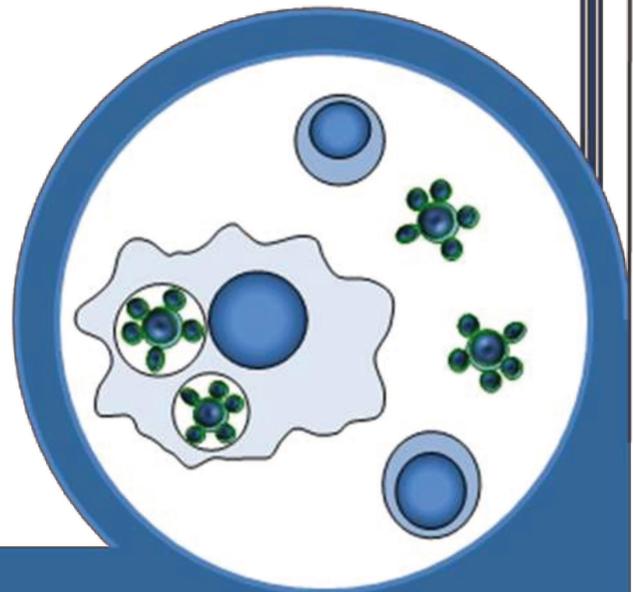
O mesmo tipo de co-cultura foi realizado em 2 placas de 24 orifícios (Corning) contendo DCs no 8º dia (1×10^5 células/orifício), obtidas após a estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), CD40L 10% ou apenas meio (SE) e células não aderentes autólogas (1×10^6 células/orifício), por 5 dias na presença de cAg de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265 - 10 µg/mL). Posteriormente as células foram removidas da placa para marcação de superfície (anti-CD4 FITC, anti-CD4 APC, anti-CD8 PECy5, anti-CD25 PECy5, anti-CD45RA FITC, anti-CD45RO PE e anti-CD69 PE) e intracelular (anti-Foxp3 PE) avaliada por citometria de fluxo.

Na segunda placa as co-culturas foram estimuladas com PMA (50 ng/mL - Sigma), ionóforo de cálcio (250 ng/mL - Sigma) e Brefeldina (2,5 ng/mL - Sigma) e incubadas em estufa com 5% de CO₂ por 6 horas. Após este período as células foram recolhidas para marcação de superfície com anti-CD3 FITC, anti-CD3 PE e anti-CD8 PECy5. Em seguida foram submetidas à fixação com paraformaldeído a 0,5% por 30 minutos, permeabilização com saponina 5% por 10 minutos e, posteriormente, à marcação intracelular com anti-IL-2 PE, anti-IL-17 PE, anti-IL-10 PE e anti-IFN-γ FITC e avaliadas por citometria de fluxo (93).

13. Análise estatística

A comparação das variáveis nos diversos grupos foi realizada utilizando-se o método não paramétrico de *Mann-Whitney*. A comparação entre as variáveis obtidas com os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo foi realizada pelo método de *Wilcoxon*. Foram consideradas significantes diferenças com valor de $p \leq 0,05$.

Resultados



1. Delineamento experimental

Monócitos obtidos por aderência a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 16 indivíduos saudáveis [grupo controle (C)], 15 pacientes com a forma adulta (FA) e 12 pacientes com a forma juvenil da PCM (FJ), foram cultivados *in vitro* com GM-CSF e IL-4, por 7 dias. No 2º e 5º dias após o início da cultura as células aderentes receberam citocinas frescas, sem a troca de meio de cultura. No 7º dia as células foram removidas do frasco. Uma parte foi submetida à marcação de superfície para CD83, CD1a, CD209, CCR7, CD80, CD86, HLA I, HLA II, TLR-2, TLR-4, dectina-1, CD14 e CD11c. Células do grupo controle foram testadas quanto à capacidade de fagocitar partículas de Dextran (PM 40 kDa).

O restante das células foi estimulado com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18, alta virulência ou Pb265, baixa virulência), CD40L ou apenas meio (sem estímulo, SE), por 18h. Outra parte das células foi estocada para posterior extração de RNA e avaliação da expressão gênica de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-12p35, IL-23p19, IL-6, IL-10 e TGF- β). As células (8º dia) também foram submetidas à nova pesquisa de marcadores de superfície celular (descritos acima) e no grupo controle foi realizada nova avaliação da capacidade de fagocitose.

O restante da cultura foi utilizado como estímulo para linfócitos T autólogos com posterior avaliação dos seguintes parâmetros: 1) capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ autólogos; 2) capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T com fenótipo regulatório (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺); 3) expressão de marcadores de linfócitos T *naive* (CD45RA⁺) e de memória (CD45RO⁺) e de linfócitos ativados (CD69⁺); 4) capacidade de produção de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN- γ (detecção intracelular).

2. Células aderentes estimuladas durante 7 dias com GM-CSF e IL-4 se diferenciam em células dendríticas com fenótipo imaturo.

Com o intuito de verificar se células aderentes do sangue periférico (população AD⁺) eram induzidas à diferenciação em DCs com fenótipo imaturo (iDCs) após a estimulação com GM-CSF e IL-4, foi avaliada a expressão de CD14, CD11c, CD83, CD209, CD1a, CCR7, CD80 e CD86.

Após 7 dias de estimulação das células aderentes com citocinas ocorreu uma mudança de fenótipo com uma significativa redução da expressão do CD14 e uma baixa expressão do CD83, CCR7, CD80/B7.1 e CD86/B7.2. Por outro lado, observamos elevada expressão de CD1a, CD209 e CD11c (Fig. 2).

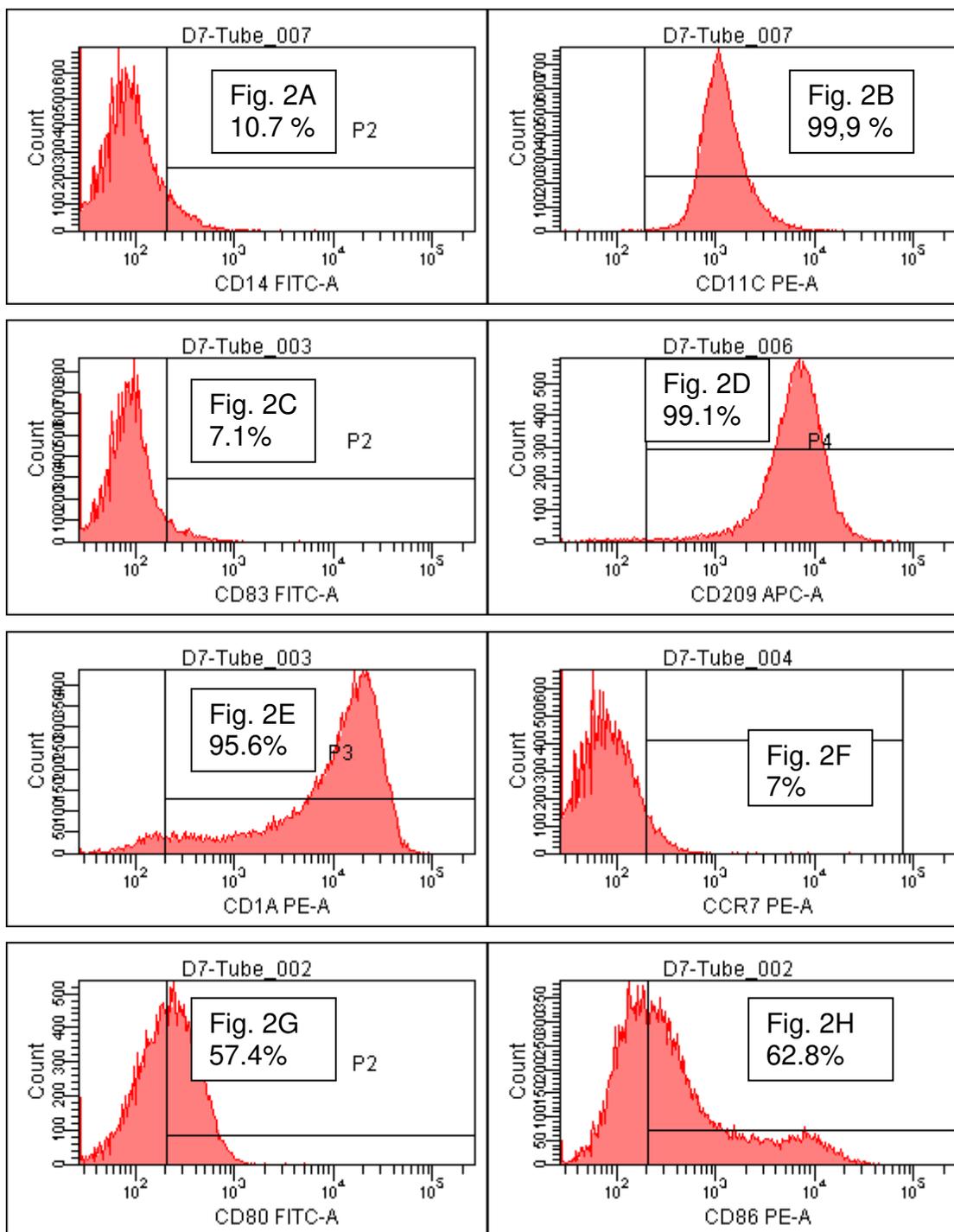


Figura 2: Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo caracterizando a diferenciação da população de células aderentes (AD^+) em células dendríticas imaturas (iDCs) após 7 dias de estimulação com GM-CSF e IL-4. **(A)** CD14 **(B)** CD11c, **(C)** CD83, **(D)** CD209, **(E)** CD1a, **(F)** CCR7, **(G)**, CD80 e **(H)** CD86.

3. DCs estimuladas com células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) se diferenciam em células com fenótipo maduro.

Com o intuito de verificar se DCs imaturas (7º dia SE) eram induzidas à diferenciação em células com fenótipo maduro após a estimulação com células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265), foi avaliada a expressão de CD83, CD1a, CD209 e CCR7.

Do 7º para o 8º dia ocorreu um aumento da frequência de células CD83⁺, marcador DCs humanas maduras e fenotipicamente competentes, nos 3 grupos estudados e em todas as condições, inclusive na ausência de estímulo (SE). Tanto Pb18 como Pb265 estimularam a expressão de CD83 em níveis superiores àqueles observados na condição 8º dia-SE nos pacientes e controles. No grupo C observamos que a expressão do CD83⁺ foi maior em DCs que foram estimuladas pelas células leveduriformes da cepa Pb265, quando comparado com a estimulação por células leveduriformes da cepa do Pb18. A estimulação com CD40L (controle positivo) resultou no aumento da frequência de células CD83⁺ em relação ao 7º e 8º dia SE, sem diferenças entre os grupos (Fig. 3A).

Considerando a Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) os valores mostraram que os 2 grupos de pacientes (FA e FJ) apresentaram menor expressão do CD83 no dia 7º e 8º após os diferentes estímulos (SE, Pb18, Pb265 e CD40L) em relação ao grupo controle (fig. 1B). Verificamos também que existe uma diminuição significativa da expressão deste marcador em DCs de pacientes com a FJ que foram estimuladas com ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) em relação ao grupo C. Similarmente aos dados de frequência (fig. 3A), a análise da MFI também mostrou que no grupo C a expressão do CD83⁺ foi maior em DCs que foram estimuladas por células leveduriformes do Pb265, quando comparado com células leveduriformes do Pb18 (fig. 3B). Ver histograma representativo na figura 2 no anexo 7.

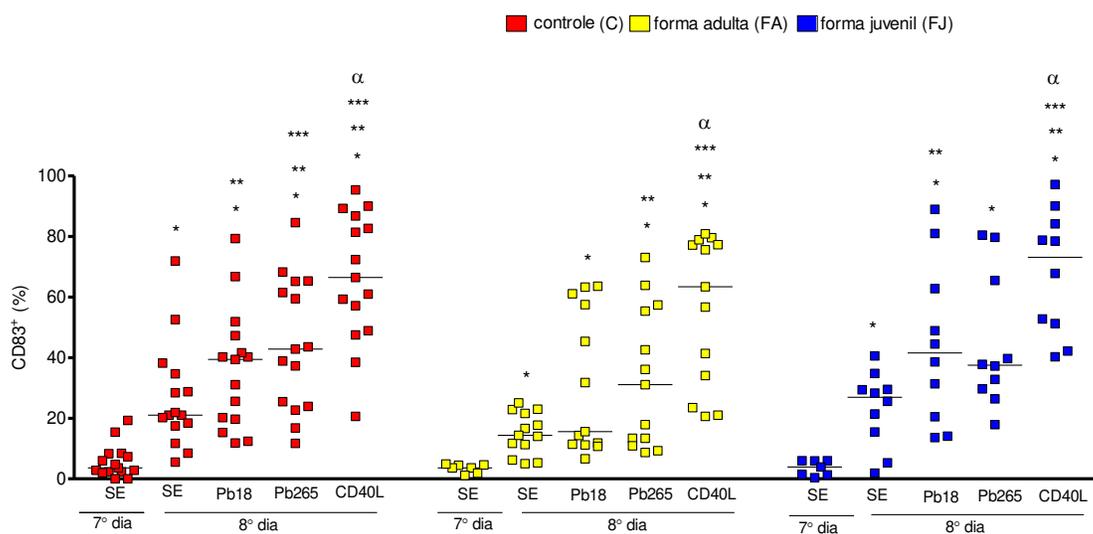
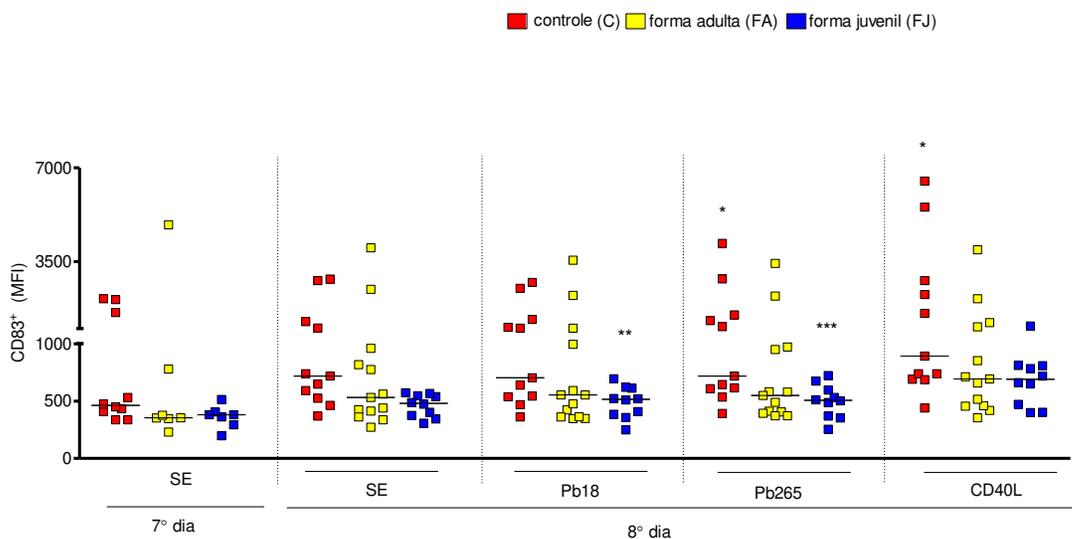
A**B**

Figura 3: Frequência (%) de células CD83⁺ **(A)** e Média da Intensidade de Fluorescência (MFI) da molécula CD83⁺ **(B)**. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e pacientes com a forma juvenil (FJ) da PCM foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (D7 SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=15, FA: n=13, FJ: n=10).

Figura 3A: * $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao 8º dia SE, *** em relação a Pb18, α em relação a Pb265 (Wilcoxon).

Figura 3B: * $p < 0.05$ em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos da figura 3B: **Pb18:** ** $p < 0.05$ FJ vs C; **Pb265:** *** $p < 0.05$ FJ vs. C (Mann-Whitney).

A diferenciação de monócitos em DCs é caracterizada pela diminuição da expressão de CD1a, após a maturação.

Observamos que após a estimulação com células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) ocorre uma diminuição da frequência de células CD1a⁺ (Fig. 4) e da MIF (dados não mostrados). A resposta foi semelhante nos 3 grupos (C, FA, FJ) com uma queda mais acentuada no grupo FA quando comparado com o grupo FJ. Nos grupos C e FA verificou-se uma diminuição significativa da frequência de células CD1a⁺ após estimulação com as células leveduriformes do fungo, quando comparado células no 8º dia SE, sugerindo a indução da maturação destas células. Foi verificado ainda que nos grupos C e FA ocorreu uma diminuição significativa da frequência células CD1a⁺ após a estimulação com células leveduriformes da cepa Pb265, quando comparado com Pb18 (Fig. 4).

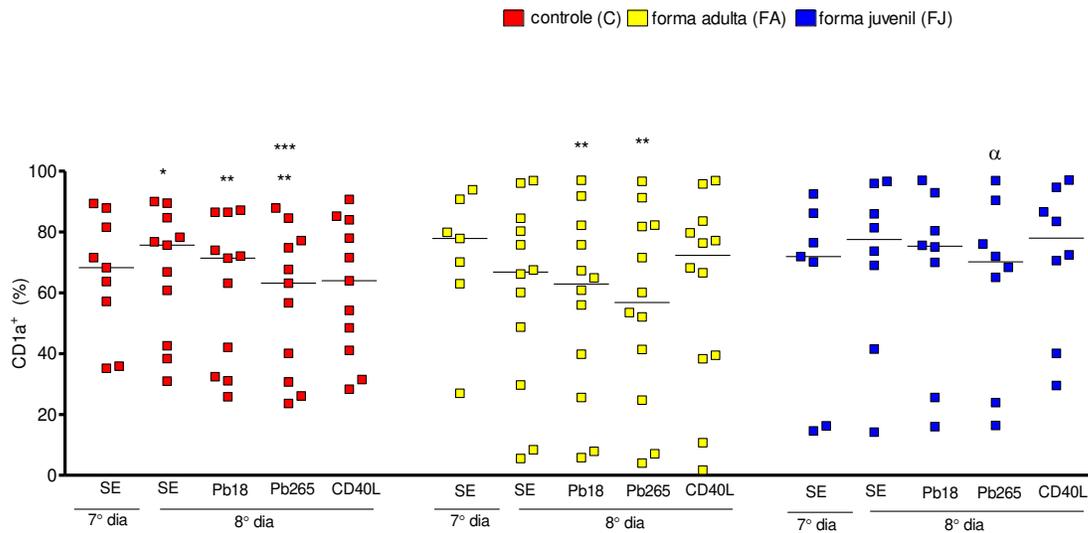


Figura 4: Frequência (%) de células CD1a⁺. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=11, FA: n=12, FJ: n=8).

*p < 0.05 em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao D8 SE, *** em relação ao Pb18, α p < 0.05 em relação ao CD40L. (Wilcoxon)

Outro marcador avaliado foi o CD209 (DC-SIGN), que está envolvido na endocitose de alguns fungos patogênicos. A perda da capacidade de endocitose das DCs com fenótipo maduro pode ser relacionada à diminuição da expressão desta molécula de superfície.

Tanto no 7º e 8º dia de cultura observamos que células de pacientes com PCM expressaram uma maior quantidade de moléculas CD209⁺ comparado ao grupo controle. Por outro lado, a estimulação com células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) induziu uma diminuição significativa da expressão de CD209, de forma mais acentuada no grupo C comparado aos pacientes (FA e FJ) (Fig. 5).

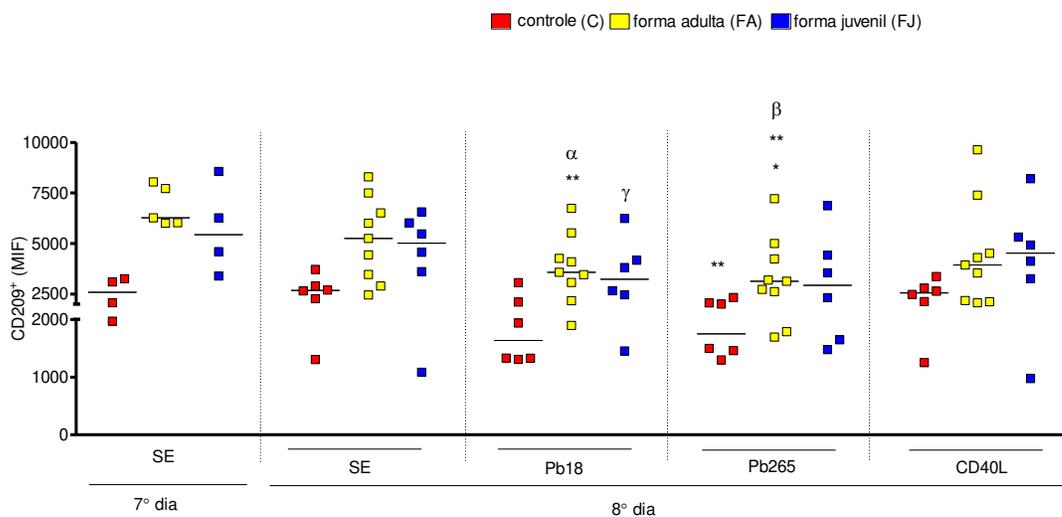


Figura 5: Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) da molécula CD209⁺. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=6, FA: n=9, FJ: n=6).

* $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos: Pb18: α $p < 0.05$ FA vs. C; **Pb265:** β $p < 0.05$ FA vs. C; **Pb18:** γ $p < 0.05$ FJ vs. C (Mann-Whitney).

A expressão de CCR7 em DCs após a sua estimulação com antígenos permite a sua migração para linfonodos onde ocorre a apresentação de antígenos para os linfócitos. Em nosso estudo foi observado um aumento discreto na frequência de células CCR7⁺ no 8º dia, um pouco mais elevado após a estimulação com células leveduriformes Pb265, sugerindo que esta cepa do fungo induz um melhor processo de maturação das DCs. Por outro lado, a estimulação com CD40L resultou no aumento da frequência de células positivas, sem diferenças entre os grupos (Fig. 6A). A análise da MIF mostrou que somente as células dos pacientes do grupo com a FJ apresentaram uma diminuição significativa da quantidade de moléculas CCR7⁺, após a estimulação com Pb265, quando comparado a Pb18 e também em relação ao mesmo estímulo (Pb265) em relação ao grupo C (Fig. 6B).

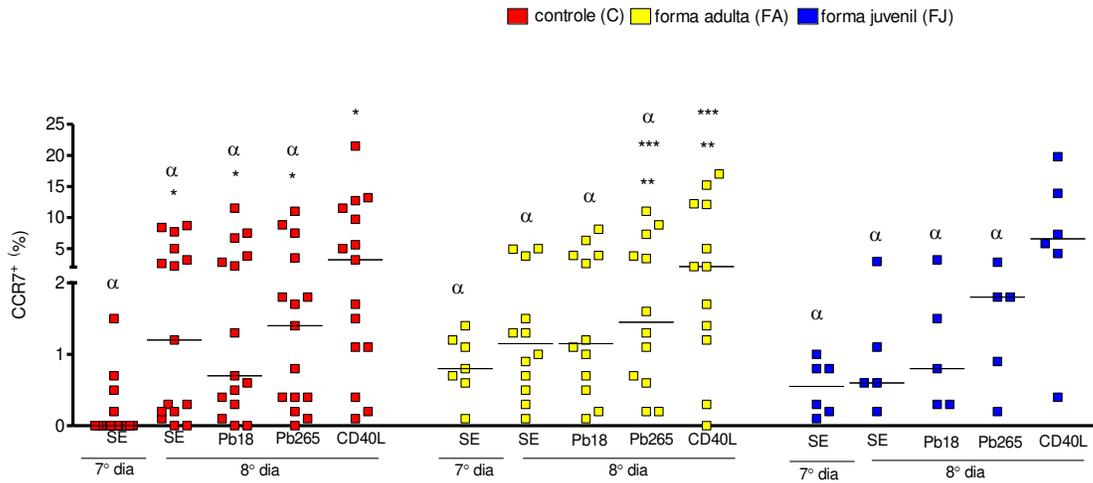
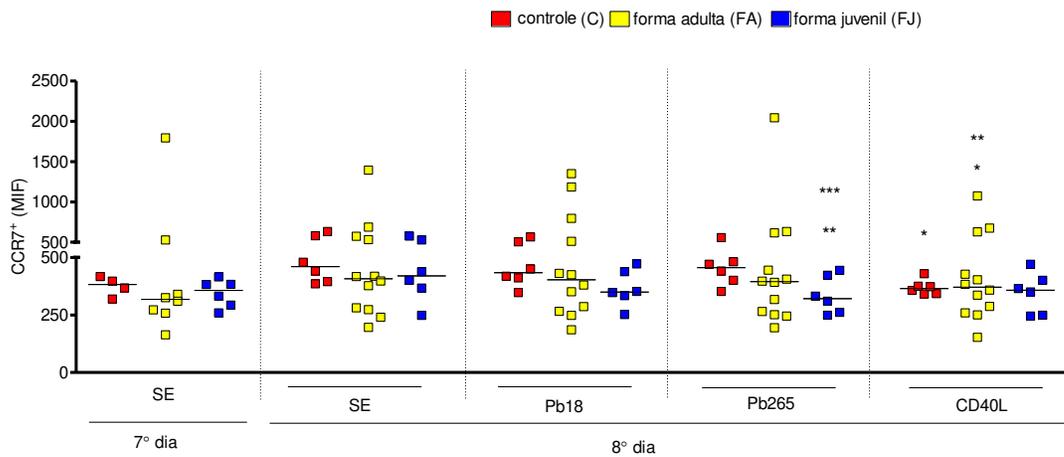
A**B**

Figura 6: Frequência (%) de células CCR7⁺ **(A)** e Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) da molécula CCR7⁺ **(B)**. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=15, FA: n=12, FJ: n=6).

Figura 6A: * $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao 8º dia SE, *** em relação ao Pb18, α em relação ao CD40L (Wilcoxon).

Figura 6B: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE, ** em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos da figura 6B: Pb265: *** $p < 0.05$ FJ vs C. (Mann-Whitney)

Além dos marcadores de superfície outro parâmetro utilizado para avaliar a maturação das DCs é a diminuição da sua capacidade fagocítica. Para tal realizamos um ensaio funcional de fagocitose utilizando somente células de indivíduos controles.

Conforme verificado na figura 7 a porcentagem de células dextran⁺ foi maior no 7^o dia e 8^o dia de incubação sem estímulo (SE). A estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, bem como com CD40L por 18h induziu uma diminuição significativa da capacidade de fagocitose, indicando que ocorreu a maturação das DCs. Além disso, pode-se observar que a frequência de células dextran⁺ foi maior após estimulação com células leveduriformes Pb265, sugerindo que esta cepa do fungo (baixa virulência) induz maturação de forma mais eficiente. O CD40L (controle positivo) também induziu uma acentuada diminuição do índice de fagocitose.

A análise microscópica das lâminas de citospin coradas com HE permitiu verificar um baixo número de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb265) no interior das DCs (figura 8).

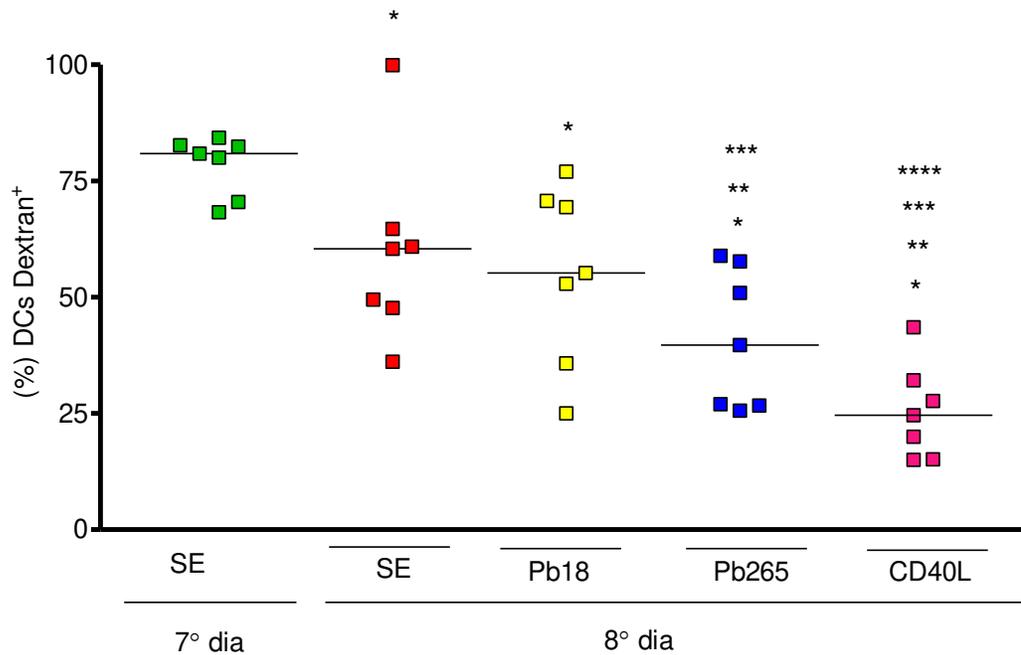


Figura 7: Porcentagem de células que fagocitaram partículas de dextran-40 conjugadas com fluoresceína (FITC). As células foram obtidas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C) cultivadas com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7^o dia SE), quando então foram estimuladas por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (n=7). *p< 0.05 em relação ao 7^o dia SE, **em relação ao 8^o dia SE, ***em relação ao Pb18, **** em relação ao Pb265 (Wilcoxon).

A capacidade de fagocitose de células leveduriformes de *P. brasiliensis* também foi avaliada. DCs imaturas após 7º dias de cultura com citocinas foram incubadas por 2h com células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* marcados com CFSE (FITC), na concentração de 1:1. Após este período foram feitas lâminas de citospin, coradas com Hematoxilina-Eosina. A figura 6 mostra células leveduriformes do fungo (Pb265) no interior de uma DC.



Figura 8: Células obtidas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C) cultivadas com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE) com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb265) (setas) no seu interior. HE 1000x.

Utilizando a microscopia de fluorescência também foi possível verificar a presença de células leveduriformes marcadas com CFSE (FITC – cor verde), algumas com brotamentos, no interior de DCs marcadas com anti-CD83 PE (coloração vermelha) (Fig. 9).

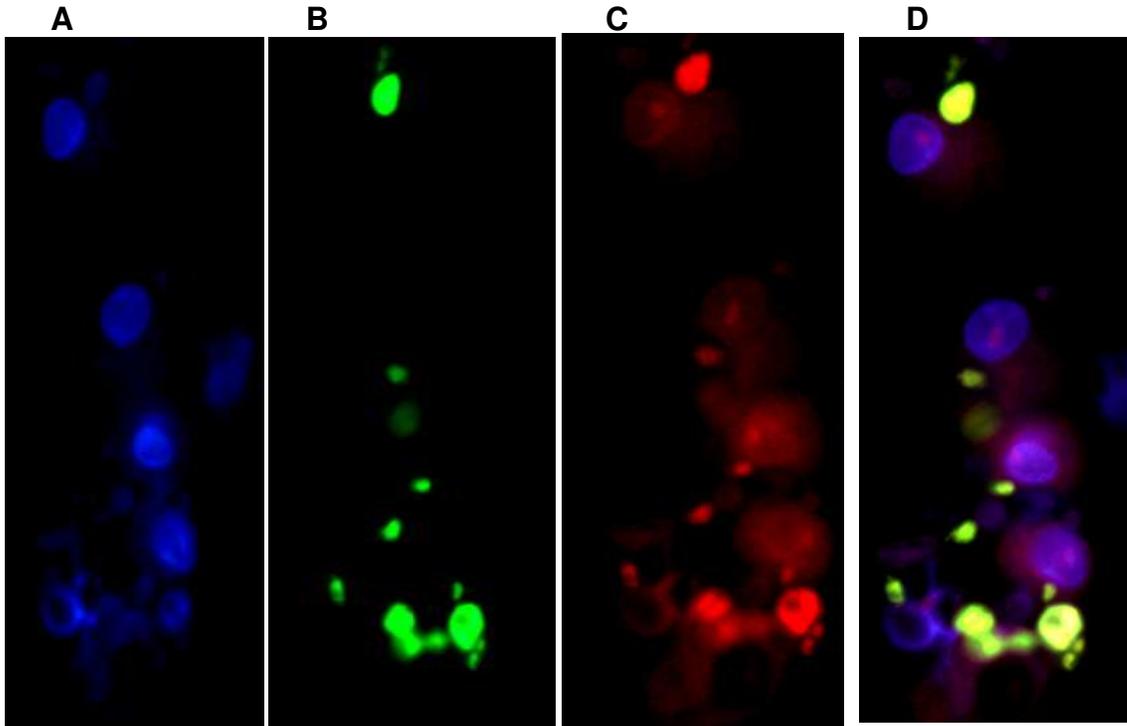


Figura 9: Células obtidas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle cultivadas com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE) foram pulsadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb265) por 18h. **A:** Marcação do núcleo das DCs com DAPI (azul). **B:** Células leveduriformes do fungo (Pb265) marcadas com CFSE (verde). **C:** Marcação de DCs com o anticorpo anti-CD83 PE (vermelho). **D:** *Overlay* => DCs CD83⁺ (vermelho) com células leveduriformes do fungo (verde) em seu interior. Aumento de 40x.

O principal papel das DCs maduras é a apresentação de antígenos aos linfócitos T. Para verificar a expressão de marcadores relacionados a esta função analisamos a expressão das moléculas de coestimulação (CD80/B7-1, CD86/B7-2) e das moléculas HLA classe I e II, essenciais para a apresentação de antígenos e estimulação de linfócitos T.

Em relação à expressão das moléculas CD80/B7-1 e CD86/B7-2 foi observado que do 7º para o 8º dia ocorre um aumento da frequência de células positivas em todos os grupos e para todas as condições, inclusive na ausência de estímulo (figs. 10A e 10B). Contudo, na FA observamos uma frequência menor de células CD80/B7-1⁺ do que nos grupos C e FJ, quando estimuladas por ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265). Por outro lado, no grupo FJ verificou-se que a expressão desta molécula foi maior em células que foram pulsadas pelo Pb18, em relação ao Pb265 (Fig. 10A).

A avaliação da MIF mostrou que nos 2 grupos de pacientes (FA e FJ) ocorre uma menor expressão deste marcador tanto no 7º, como no 8º dia (SE, Pb18, Pb265 e CD40L), quando comparado com o grupo C. Adicionalmente, apenas no grupo controle foi verificado um aumento significativo da expressão deste marcador em células que foram estimuladas com ambas as células leveduriformes (Pb18 e Pb265), em relação ao grupo FA e FJ (Fig. 10B). Ver histograma representativo na figura 3 no anexo 8.

A figura 9 representa os resultados referentes à molécula CD86/B7-2⁺. Pacientes com a FA apresentaram uma frequência maior de células CD86/B7-2⁺ em relação ao grupo C, quando estimuladas por ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) (Fig. 11A). A análise da MIF também mostrou uma maior expressão de células positivas nos pacientes com a FA, em relação aos demais grupos (Fig. 11B). Ver histograma representativo na figura 4 no anexo 9.

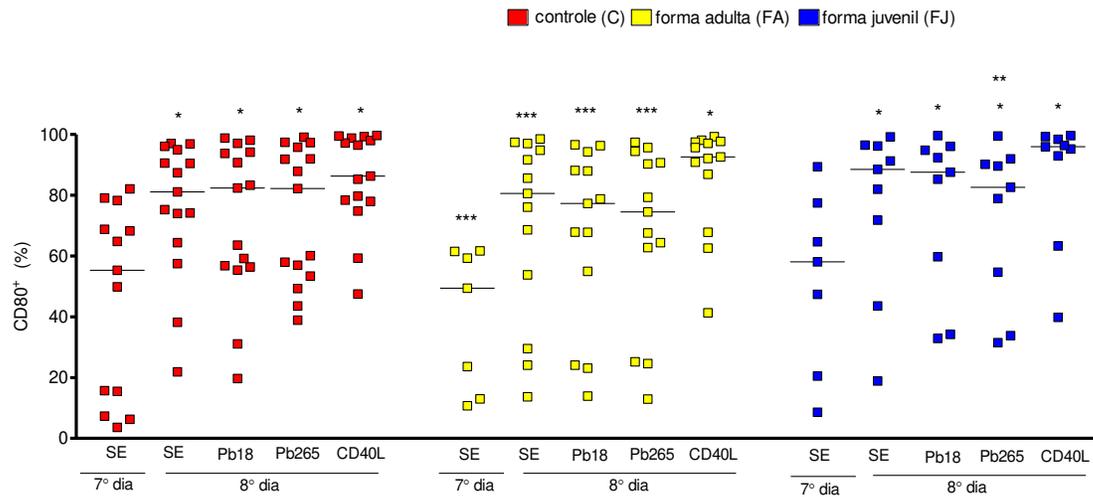
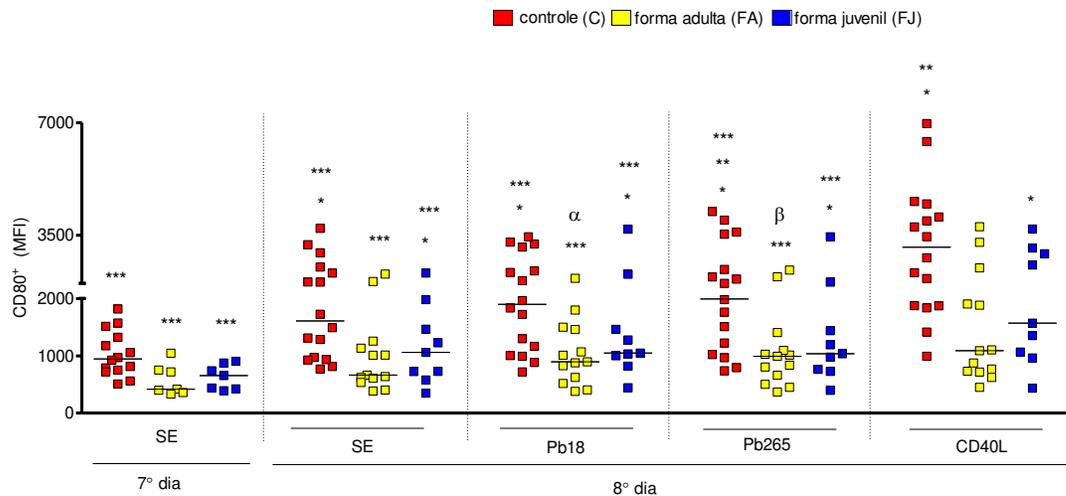
A**B**

Figura 10: Frequência (%) de células CD80⁺ (**A**) e Média da Intensidade de Fluorescência (MFI) da molécula CD80⁺ (**B**). Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=15, FA: n=13, FJ: n=9).

Figura 10A: *p< 0.05 em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao Pb18, *** em relação ao CD40L (Wilcoxon).

Figura 10B: *p< 0.05 em relação ao 7º dia SE, ** em relação a 8º dia SE, *** em relação ao CD40L (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos da figura 10B: Pb18: α p< 0.05 FA vs. C; **Pb265:** β p< 0.05 FA vs. C (Mann-Whitney)

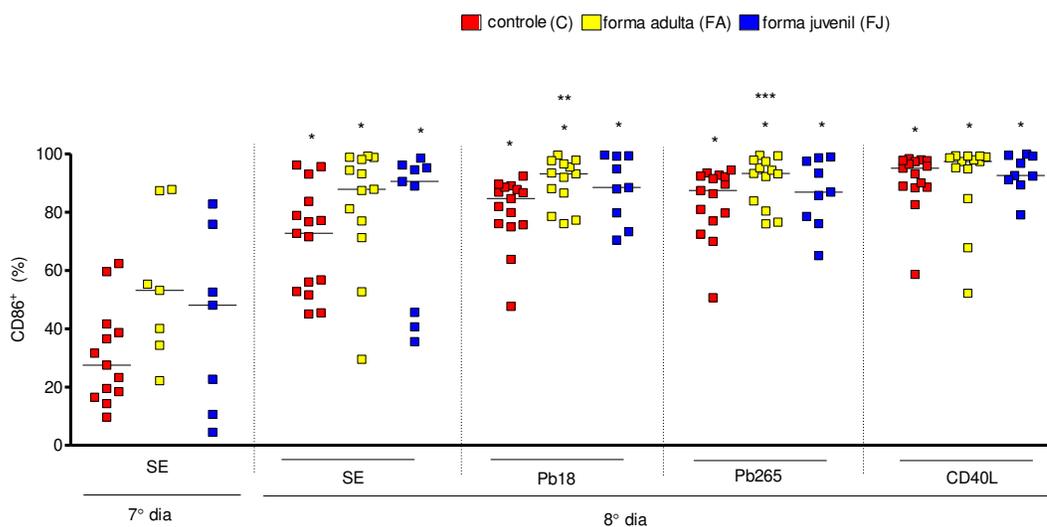
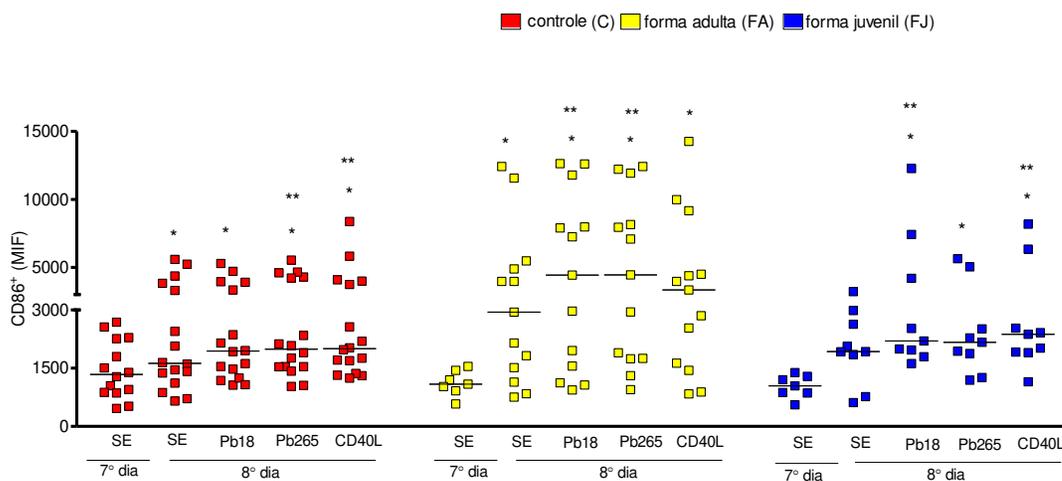
A**B**

Figura 11: Frequência (%) de células CD86⁺ **(A)** e Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) da molécula CD86⁺ **(B)**. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º DIA SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=15, FA: n=13, FJ: n=9).

Figura 11A: * $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE (Wilcoxon e ANOVA).

Comparação entre os grupos da figura 11A: Pb18: ** $p < 0.05$ FA vs C; **Pb265:** *** $p < 0.05$ FA vs. C (Mann-Whitney).

Figura 11B: * $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao 8º dia SE (Wilcoxon).

Em relação à molécula de HLA classe I, os resultados mostraram que do 7° para o 8° SE dia ocorre leve aumento da frequência de células positivas. A estimulação com CD40L resultou em aumento da expressão deste marcador, sem diferenças entre os grupos. Adicionalmente, a estimulação com células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) induziu um significativo aumento da frequência de células HLA classe I⁺ no grupo FA, comparado com o grupo C (Fig. 12).

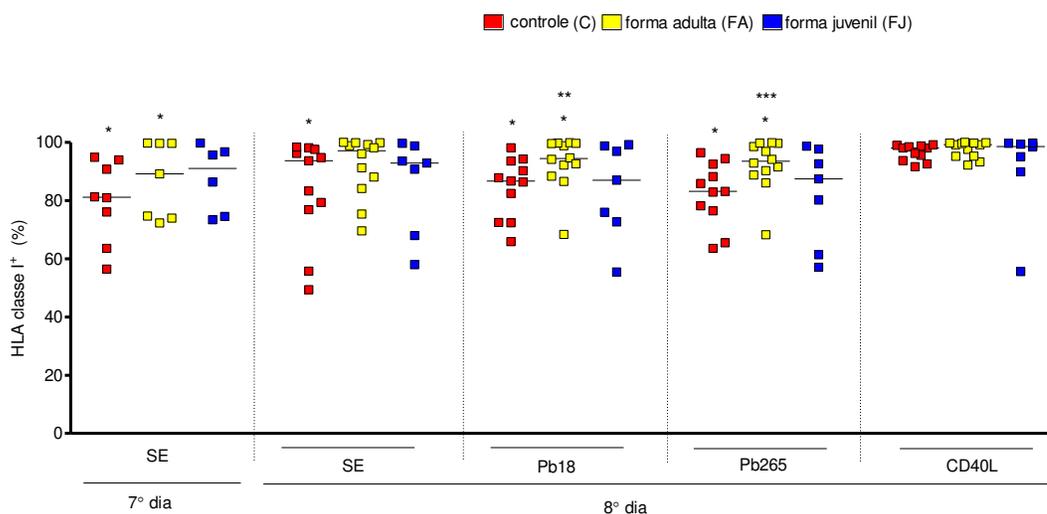


Figura 12: Frequência (%) de células HLA classe I⁺. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=11, FA: n=12, FJ: n=7).

* $p < 0.05$ em relação ao CD40L (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos: Pb18: ** $p < 0.05$ FA vs. C; **Pb265:** *** $p < 0.05$ FA vs. C (Mann-Whitney).

No que se refere à molécula HLA classe II ocorre uma alta frequência de células positivas em praticamente todos os grupos no 7º dia, que se mantém no 8º dia em relação a todos os estímulos (Pb18, Pb265 e CD40L). Também foi verificado que a estimulação principalmente com as células leveduriformes da cepa Pb18 induziu um significativo aumento da expressão de células HLA classe II⁺ no grupo FA, em relação ao grupo C (Fig. 13A).

A análise da MIF mostrou que do 7º para o 8º dia ocorre um aumento espontâneo na quantidade de moléculas HLA classe II⁺, indicando a diferenciação das células. A estimulação com CD40L também resultou no aumento significativo da expressão deste marcador, sem diferenças entre os grupos. Diferentemente dos resultados encontrados na análise da frequência, na FA foi observado uma MIF maior em células estimuladas por ambas células leveduriformes do fungo, em relação aos grupos C e FJ. Por outro lado, células dos pacientes do grupo FJ mostraram uma maior MIF após a estimulação com células leveduriformes Pb18, quando comparado com Pb265 (Fig. 13B).

Não observamos a expressão do CD14 em DCs no 7º dia SE e no 8º dia SE e após a estimulação com células leveduriformes e CD40L (ver histograma representativo na figura 5 no anexo 10). Diferentemente observamos expressão máxima do CD11c em DCs no 7º dia SE e no 8º dia SE e após a estimulação com células leveduriformes e CD40L (ver histograma representativo na figura 6 no anexo 11).

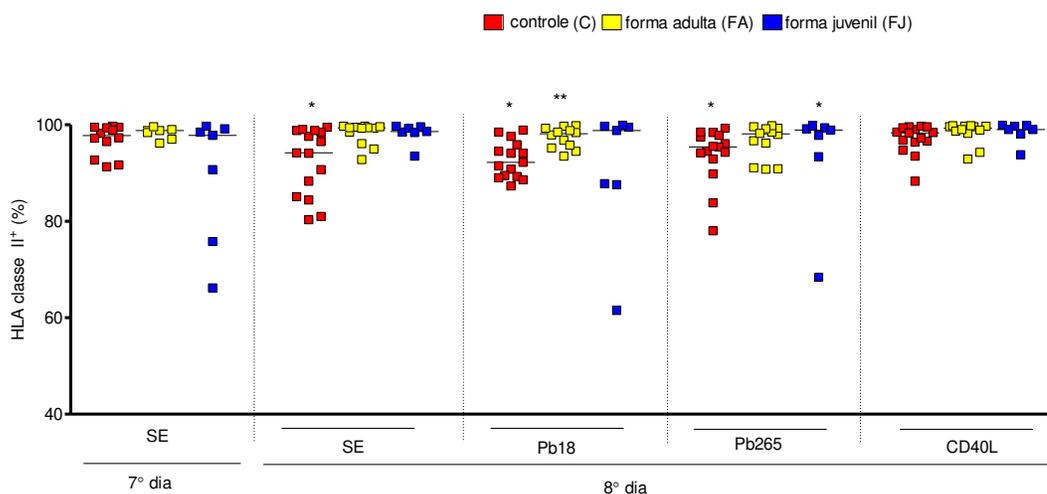
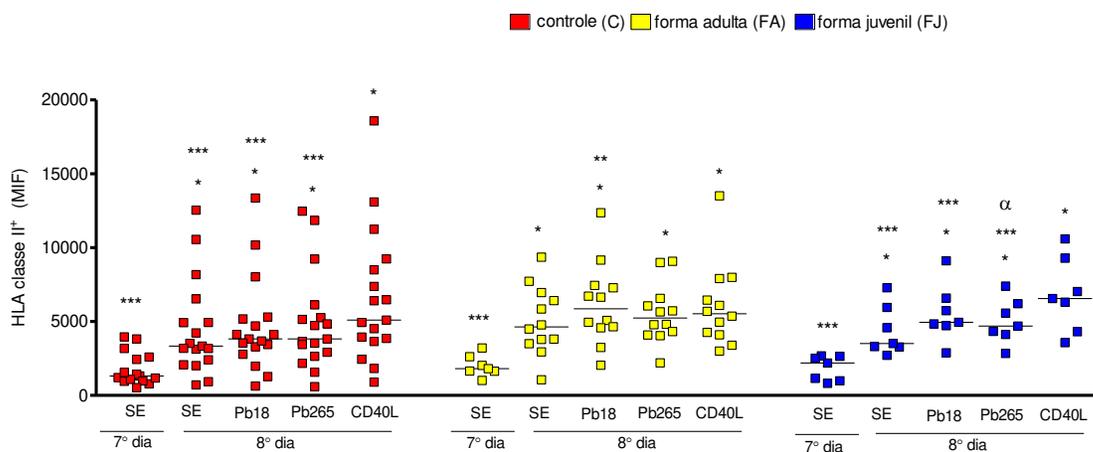
A**B**

Figura 13: Frequência (%) de células HLA classe II⁺ **(A)** e Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) da molécula HLA classe II⁺ **(B)**. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=15, FA: n=12, FJ: n=7).

Figura 13A: *p< 0.05 em relação ao CD40L (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos da figura 13A: Pb18: **p< 0.05 FA vs C (Mann-Whitney)

Figura 13B: *p< 0.05 em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao 8º dia SE, *** em relação ao CD40L, α em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

4. DCs estimuladas com células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) induzem aumento da frequência de linfócito TLR2⁺ e TLR4⁺, mas não de células dectina-1⁺

Moléculas de TLR2, TLR4 e dectina-1 estão envolvidas no reconhecimento de fungos por células do sistema imune inato.

Em nosso estudo verificamos que a frequência de linfócito TLR2⁺ (fig. 14A) e TLR4⁺ (fig. 14B) foi maior nos pacientes do que nos controles em todas as condições de cultura, mostrando a ativação desses receptores durante a doença. Células leveduriformes Pb265 foram capazes de estimular um aumento na frequência de linfócito TLR2⁺ no grupo controle, o que não se observou após a estimulação com Pb18.

Em relação à dectina-1 os resultados mostraram que do 7^o para o 8^o dia houve uma diminuição na frequência de células positivas para essa molécula, tanto no grupo controle como nos pacientes com a FA da PCM. A estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis* induziu uma diminuição ainda maior na frequência de células dectina-1⁺ em relação à condição sem estímulo. Nas culturas estimuladas com CD40L houve um aumento da frequência de células dectina-1⁺, mas somente no grupo de pacientes (Fig. 15).

Não foi possível analisar a frequência de células positivas para esse receptor nos pacientes com a FJ da PCM devido à indisponibilidade do anticorpo específico no momento em que os pacientes foram analisados.

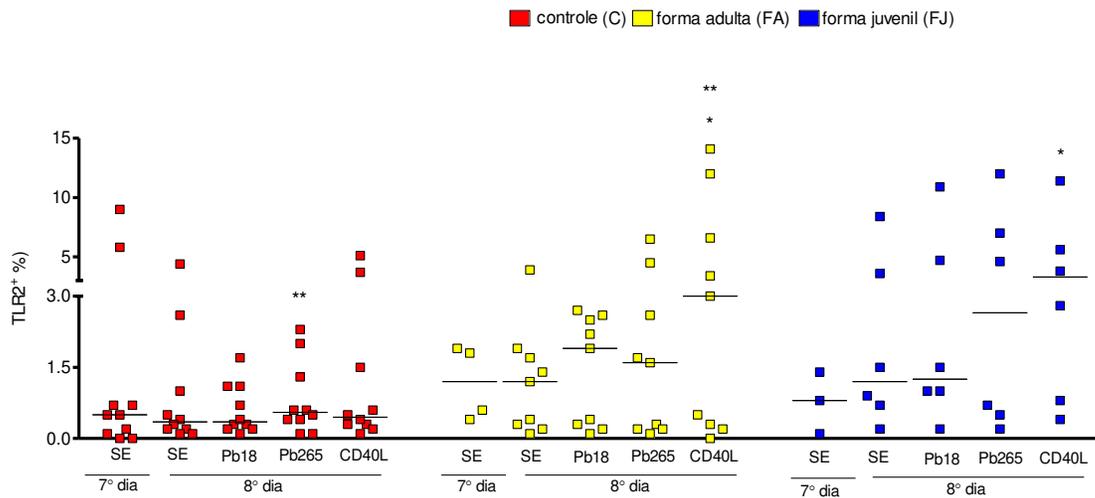
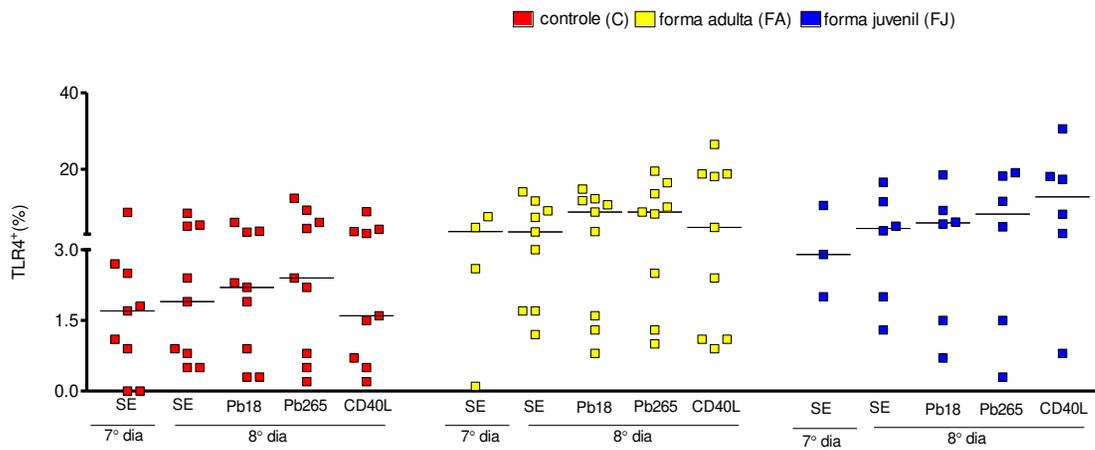
A**B**

Figura 14: Frequência (%) de linfócito TLR2⁺ (**A**) e TLR4⁺ (**B**). Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7^o dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=10, FA: n=9, FJ: n=6).

Figura 14A: *p < 0.05 em relação ao 8^o dia SE, ** em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

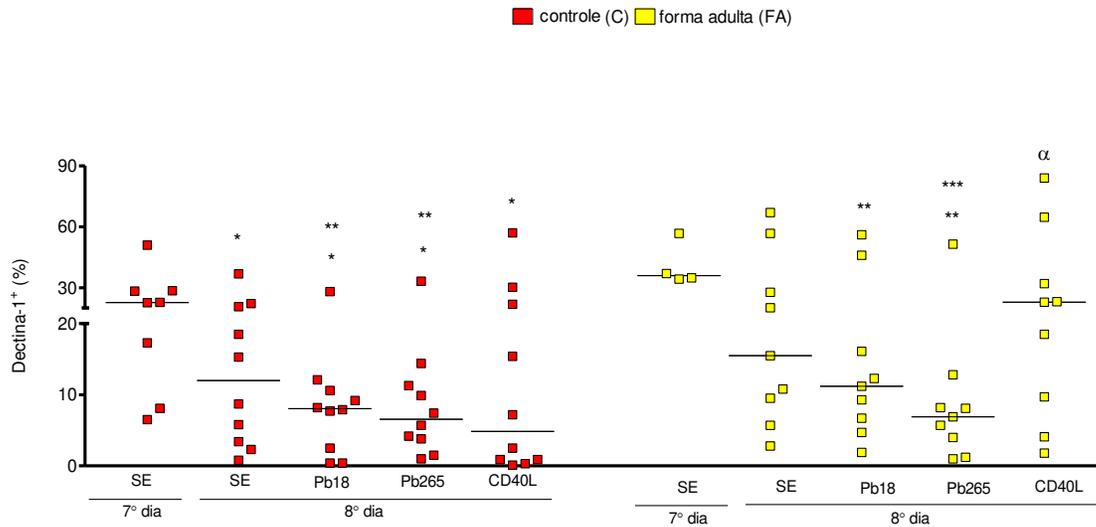


Figura 15: Frequência (%) de células dectina-1⁺. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=10, FA: n=9).

*p < 0.05 em relação ao 7º dia SE, **em relação ao 8º dia SE, *** em relação ao Pb18, α em relação ao Pb265 (Wilcoxon).

5. A estimulação de DCs com células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) induz a expressão o RNAm para citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias

Na etapa seguinte verificamos a expressão gênica de citocinas por DCs no 7º e 8º dia, pela técnica de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

Os resultados foram muito heterogêneos dentro de cada grupo, prejudicando a análise estatística. De maneira geral, como pode ser observado nas figuras abaixo, a estimulação com ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) e com CD40L resultou no aumento da expressão do RNAm para citocinas inflamatórias como TNF- α (Fig.16), IL-1 β (Fig.17), IL-12p35 (Fig.18) e IL-23p19 (Fig. 19) em relação ao 7º e 8º dias SE, sem diferenças entre os grupos.

A expressão do RNAm para TNF- α foi menor nas células de pacientes com a FJ, comparado aos grupos FA e C, embora sem diferenças significativas. Células leveduriformes Pb18 estimularam mais intensamente células de pacientes com a FA em relação ao 8º dia SE (Fig. 16).

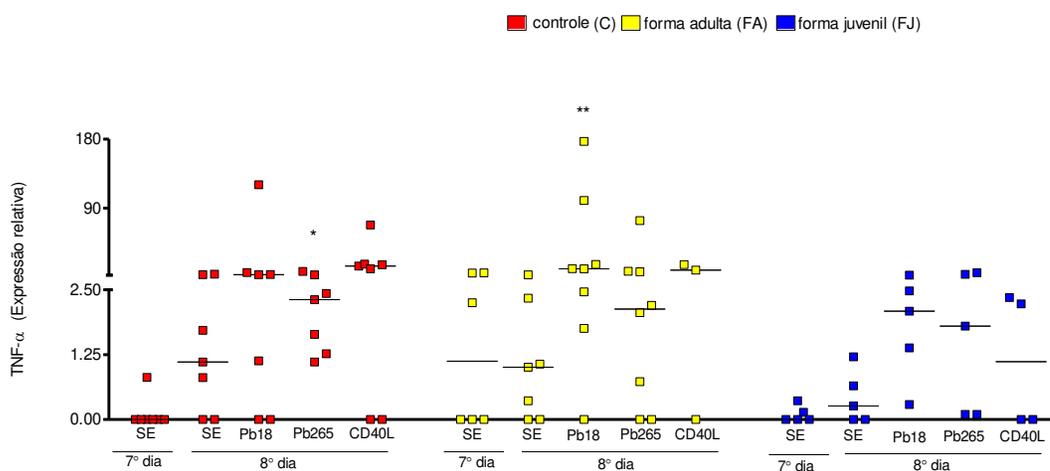


Figura 16: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para TNF- α em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao 8º dia SE. (Wilcoxon)

A estimulação com ambas as cepas do fungo também provocou maior expressão do RNAm para IL-1 β , sem diferença entre os grupos (Fig. 17).

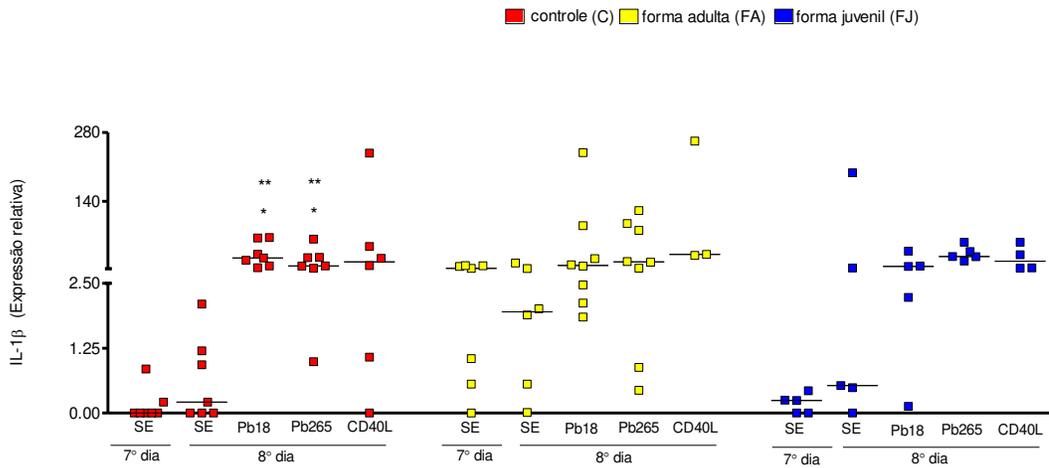


Figura 17: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-1 β em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7O DIA SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

*p< 0.05 em relação ao 7º dia SE, **em relação ao D8 SE. (Wilcoxon)

A expressão de IL-12p35 foi maior nos pacientes com a FJ após a estimulação com células leveduriformes da cepa de baixa virulência (Pb265) em relação aos grupos C e FA, sem diferença significativa entre os grupos (Fig. 18).

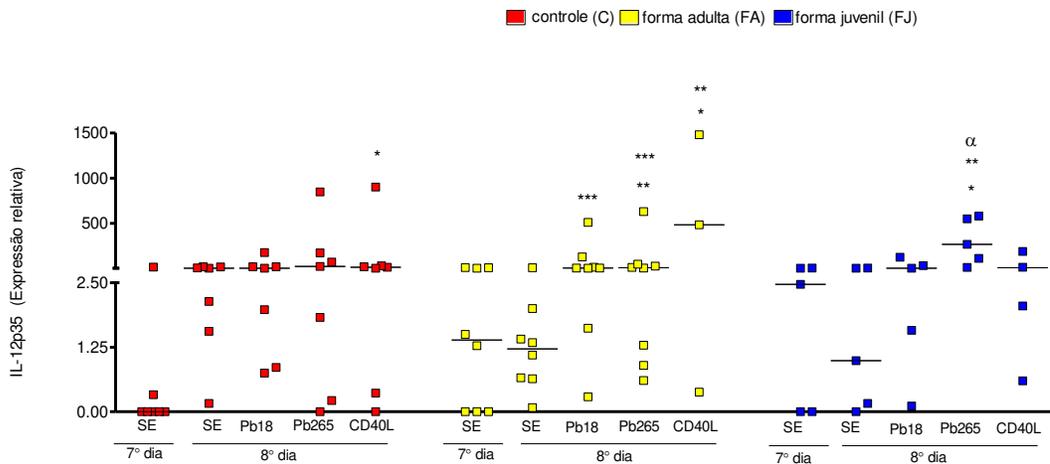


Figura 18: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-12p35 em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao 8º dia SE, *** em relação ao CD40L, α em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

A estimulação com ambas as cepas do fungo também provocou maior expressão do RNAm para IL-23p19, observada nos grupos C e FA. No entanto no grupo de pacientes com a FJ foi observado um aumento desta citocina somente após a estimulação com células leveduriformes da cepa de baixa virulência do fungo (Pb265) (Fig. 19).

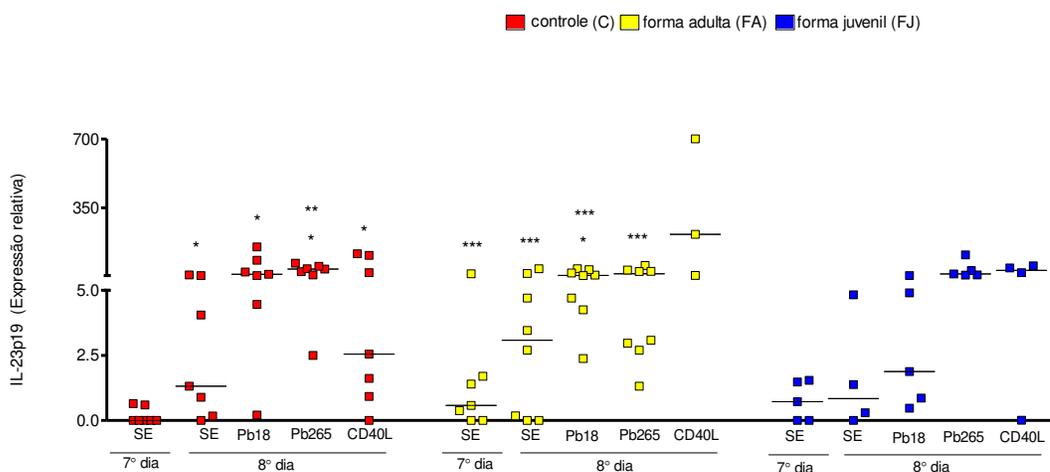


Figura 19: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-23p19 em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, **em relação ao D8 SE, *** em relação ao CD40L (Wilcoxon).

A expressão do RNAm para IL-6 sofreu menor impacto em relação às outras citocinas inflamatórias, após a estimulação com células leveduriformes do *P. brasiliensis*, sendo que os níveis mais elevados foram obtidos com a cepa Pb265, sem diferenças entre os grupos (Fig. 20).

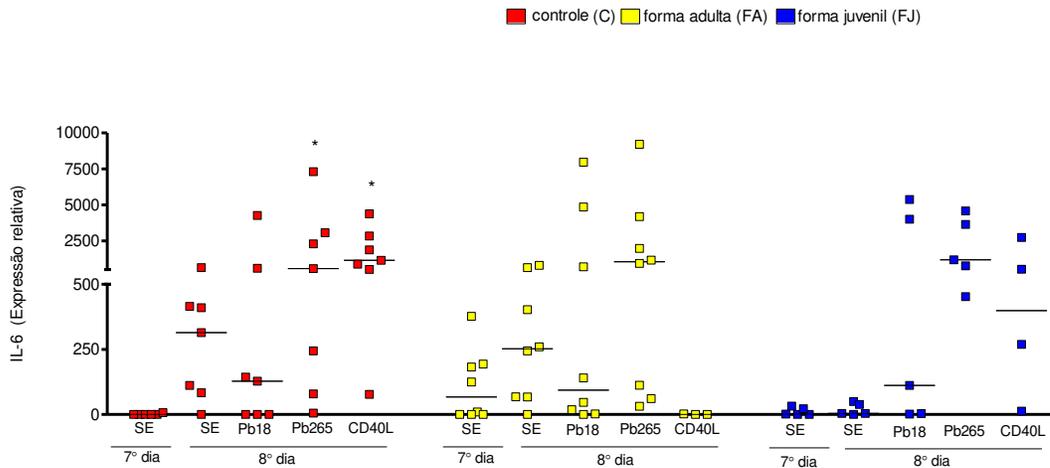


Figura 20: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-6 em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE. (Wilcoxon)

Em relação às citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) maior expressão do RNAm para IL-10 foi detectada nos pacientes com a FA e a FJ da PCM, em resposta à estimulação com Pb265. No entanto somente os pacientes com a FJ demonstraram de uma forma significativa maior expressão do RNAm para IL-10, em relação ao grupo C (Fig. 21). O mesmo foi constatado em relação ao RNAm para TGF- β , sendo que para pacientes com a FJ o melhor estímulo foi obtido com células leveduriformes Pb18 e para pacientes com a FA, células leveduriformes Pb265 (Fig. 22).

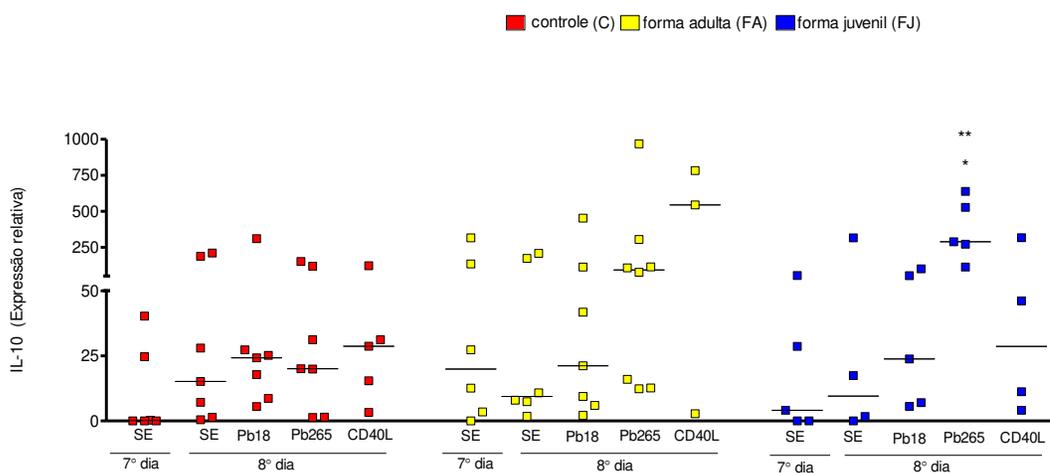


Figura 21: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para IL-10 em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao 7º dia SE, ** em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

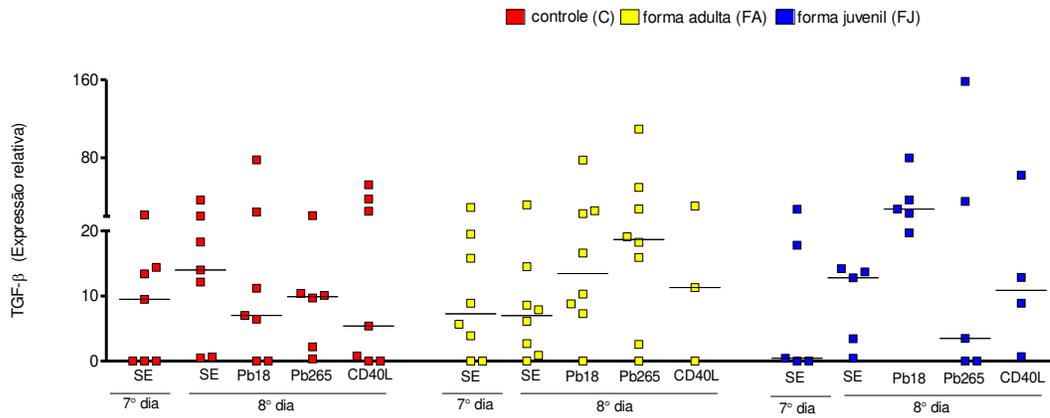


Figura 22: Análise da expressão relativa do RNA mensageiro para TGF- β em DCs. Monócitos de indivíduos do grupo controle (C), portadores da forma adulta (FA) e da forma juvenil (FJ) foram cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias (7º dia SE), quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=7, FA: n=8, FJ: n=5).

6. DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* são capazes de ativar linfócitos T autólogos

6.1- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* são capazes de induzir a proliferação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos

Os próximos experimentos objetivaram verificar se DCs geradas a partir de monócitos do sangue periférico de indivíduos controle e de pacientes com a FA e FJ DA PCM pulsadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* eram capazes de estimular a proliferação antígeno-específica de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos.

Os resultados mostraram que DCs que foram estimuladas com ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) foram capazes de induzir uma maior proliferação de linfócitos T CD4⁺ autólogos nos grupos FA e FJ, em relação à condição sem estímulo (SE). O mesmo aconteceu quando se compara a resposta proliferativa das células de pacientes em relação aos controles, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significantes (fig. 23A).

Em relação à população de linfócitos T CD8⁺, além da diferença significativa entre os índices de proliferação induzidos pela estimulação com as células leveduriformes de *P. brasiliensis*, comparado a condição sem estímulo, também foram significativas as comparações entre os grupos de pacientes com grupo controle. Diferentemente, DCs que foram estimuladas com CD40L induziram uma baixa resposta proliferativa tanto de linfócito T CD4⁺ como T CD8⁺ em todos os grupos. A adição do mitógeno na co-cultura induziu altos níveis de proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ) sem diferenças significativas [Fig. 23A e 23B].

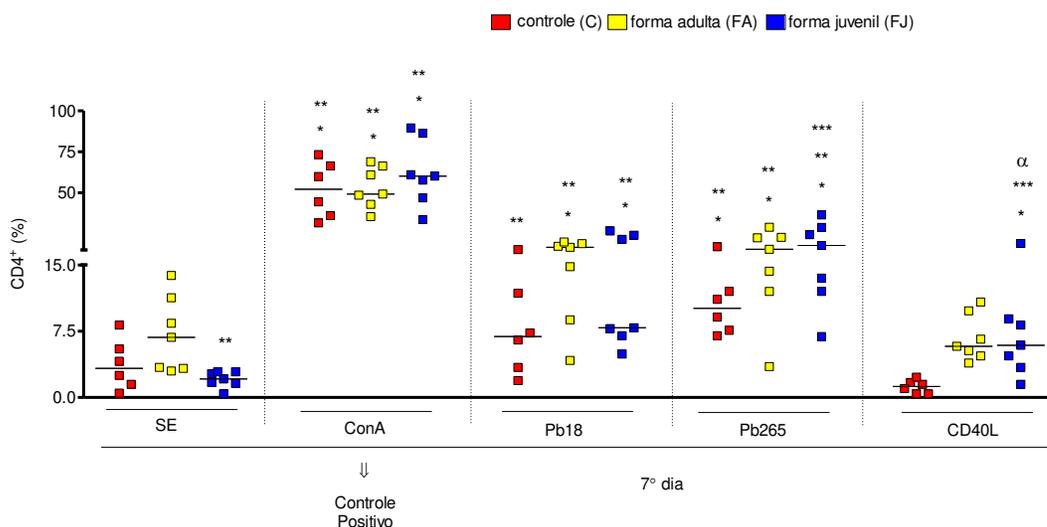
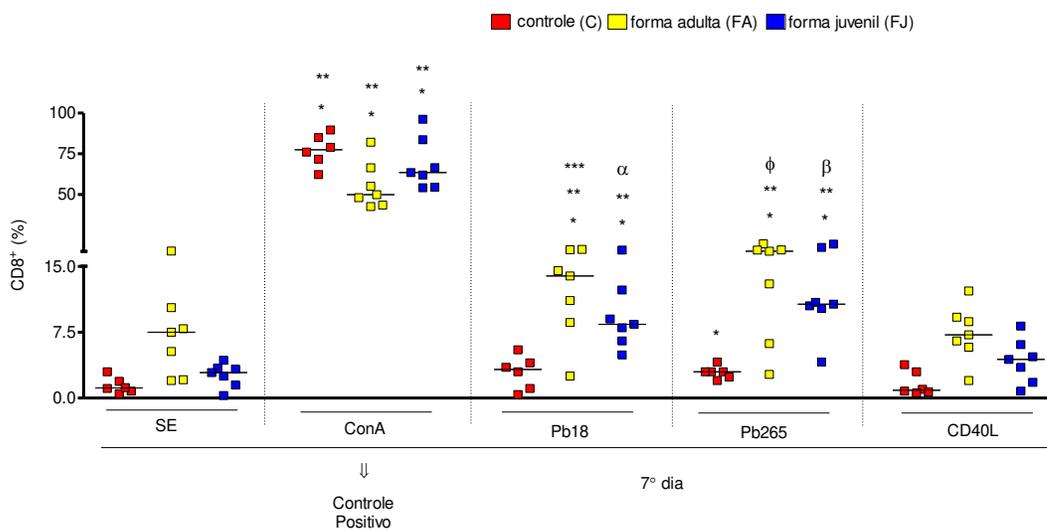
A**B**

Figura 23: Resposta proliferativa de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos marcados com CFSE após 7 dias de co-cultura com DCs. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). O mitógeno concanavalina A (ConA - 5µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células que sofreram proliferação aferida pela diminuição da intensidade de fluorescência emitida pelo CFSE. As linhas horizontais representam a mediana (C: n=6, FA: n=7, FJ: n=7).

Figura 23A: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE, ** em relação ao CD40L, *** em relação ao Pb18, α em relação ao Pb265 (Wilcoxon e ANOVA).

Figura 23B: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE, ** em relação ao CD40L (Wilcoxon e ANOVA).

Comparação entre os grupos da figura 23B: Pb18: *** $p < 0.05$ FA vs C; **Pb265:** ϕ $p < 0.05$ FA vs. C (Mann-Whitney)

Comparação entre os grupos da figura 23B: Pb18: α $p < 0.05$ FJ vs C; **Pb265:** β $p < 0.05$ FJ vs. C (Mann-Whitney)

6.2- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* são capazes de induzir linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos ativados e com fenótipo de células de memória/efetoras

Depois da avaliação da capacidade de proliferação dos linfócitos T autólogos demonstrada principalmente nos pacientes com a FA e FJ da PCM, foi analisada a expressão dos marcadores CD45RA (linfócitos T *naive*), CD45RO (células de memória) e CD69 (linfócitos ativados).

Os resultados mostraram uma diminuição da frequência de linfócitos T autólogos CD4⁺/CD45RA⁺ de pacientes com PCM, que foram estimulados com DCs pulsadas com ambas as cepas do fungo em relação à condição sem estímulo, embora as diferenças não tenham sido significativas. (fig. 24A). Na população CD8⁺, o efeito da estimulação das DCs sobre a expressão de CD45RA foi pouco evidente (fig. 24B)

Em concordância a frequência de linfócitos T autólogos CD4⁺/CD45RO⁺ estava aumentada tanto na população CD4⁺ como CD8⁺, mais evidente nos pacientes com a FA da PCM (Fig. 25A e 25B).

Estes dados também estão de acordo com os valores encontrados na análise da resposta proliferativa, maior nos pacientes do grupo FA em resposta a DCs estimuladas com ambas às cepas do fungo.

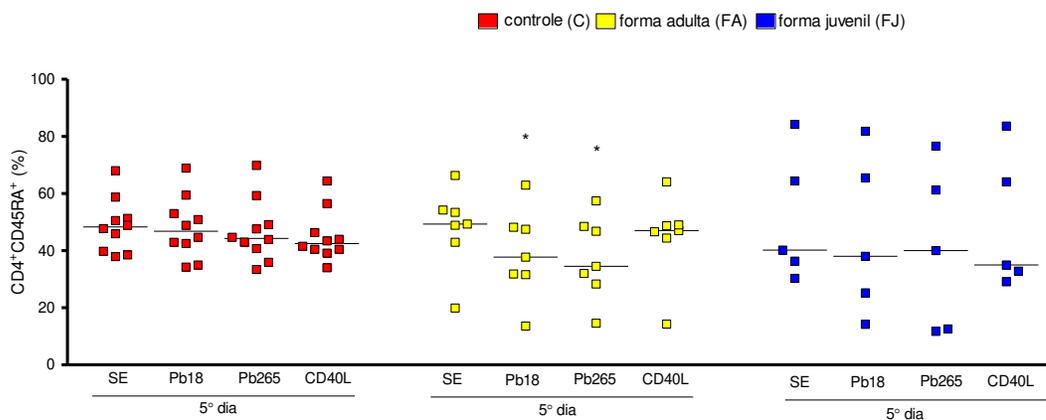
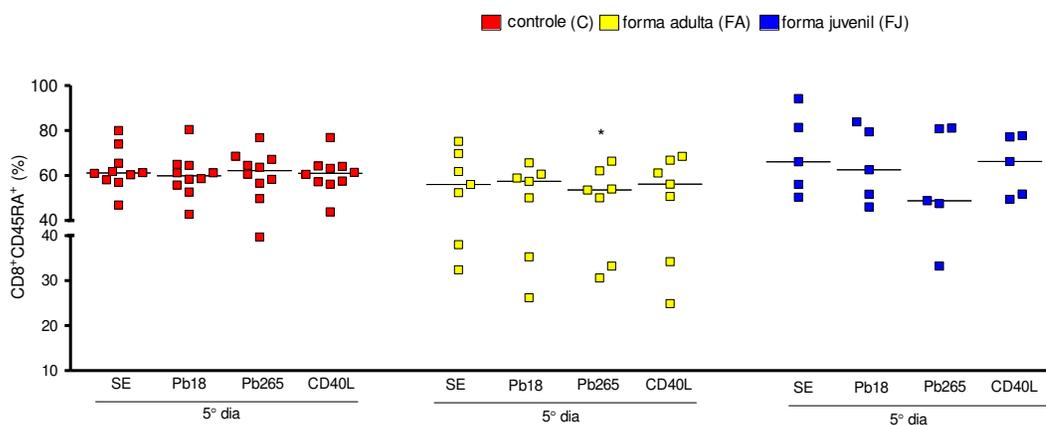
A**B**

Figura 24: Frequência (%) de células CD4⁺CD45RA⁺ **(A)** e CD8⁺CD45RA⁺ **(B)** em co-cultura de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As horizontais representam a mediana (C: n=10, FA: n=7, FJ: n=5).

Figura 24A: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE. (Wilcoxon)

Figura 24B: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE. (Wilcoxon)

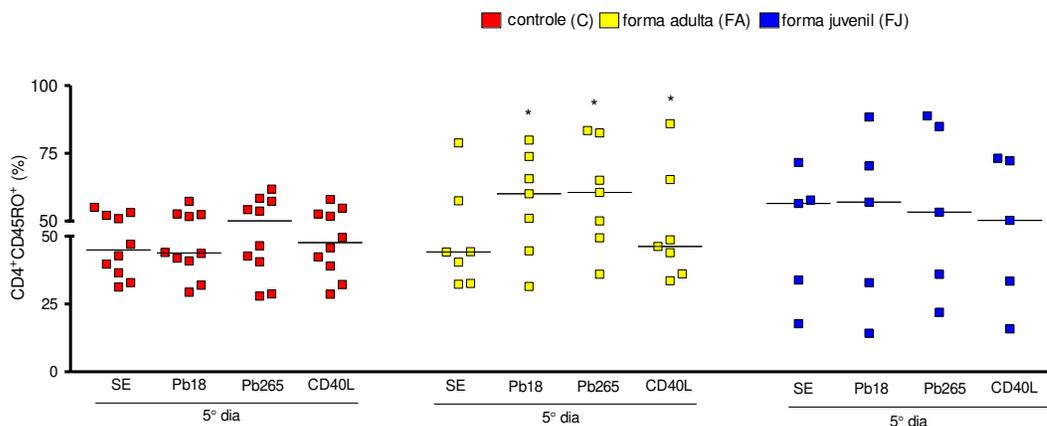
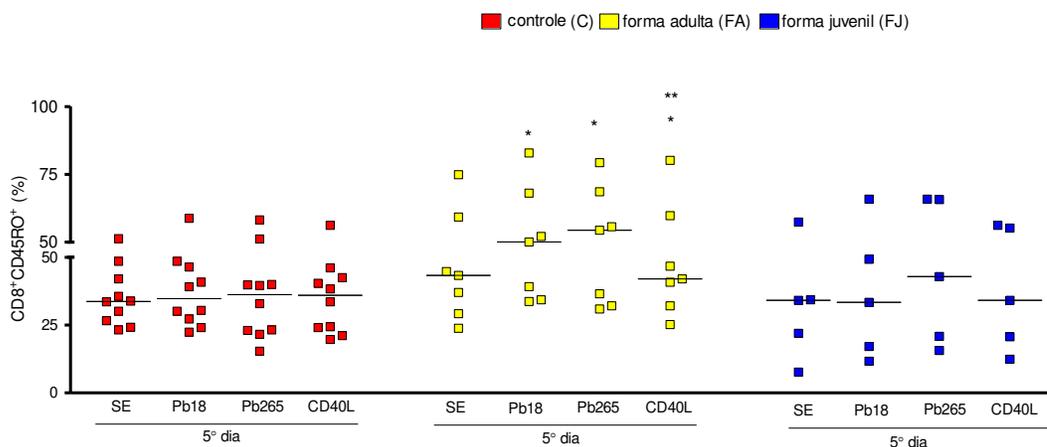
A**B**

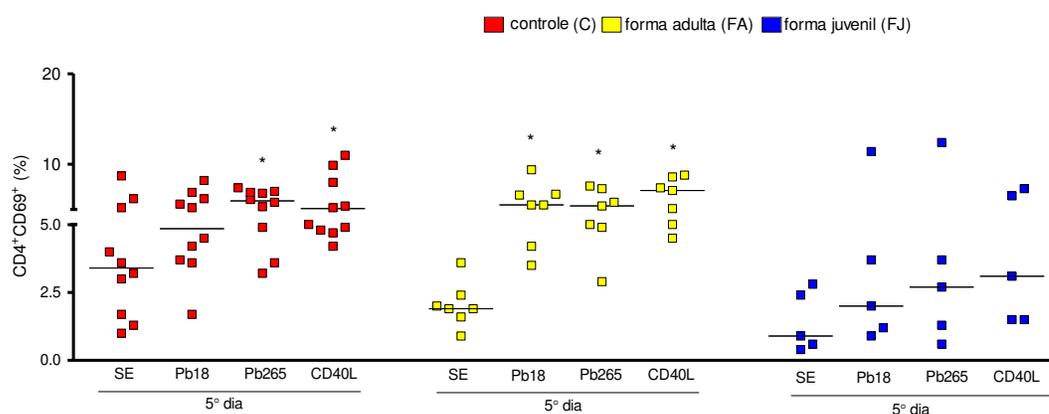
Figura 25: Frequência (%) de células CD4⁺CD45RO⁺ **(A)** e CD8⁺CD45RO⁺ **(B)** em co-cultura de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=10, FA: n=7, FJ: n=5).

Figura 25A: *p< 0.05 em relação ao 8º dia SE. (Wilcoxon)

Figura 25B: *p< 0.05 ao 8º dia SE, **em relação ao Pb18. (Wilcoxon)

Em relação análise da frequência de células $CD4^+/CD69^+$ resultados semelhantes também foram encontrados nos pacientes com a FA da PCM, mas o grupo C também demonstrou aumento deste marcador (Fig. 26A). No entanto, verificamos somente nos pacientes com a FA um significativo aumento dos linfócitos $CD8^+/CD69^+$ que foram estimuladas com DCs pulsadas com as ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265), em relação ao grupo controle (Fig 26B).

A



B

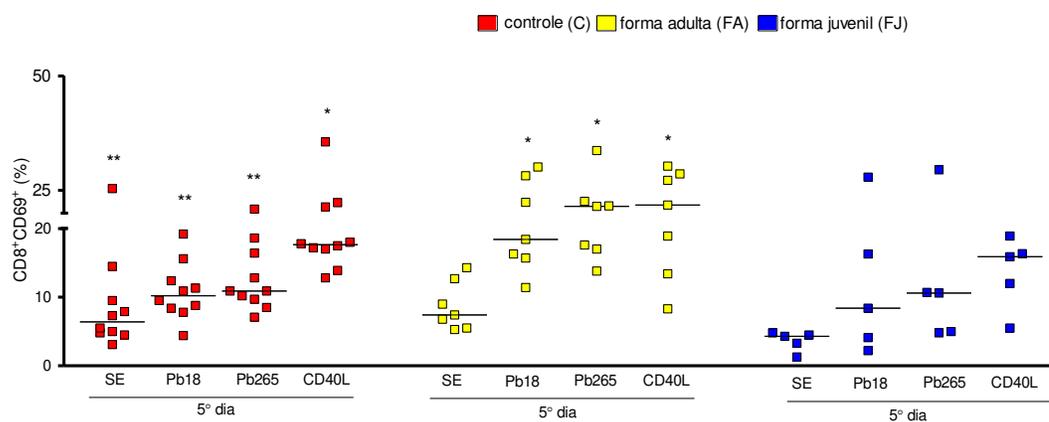


Figura 26: Frequência (%) de células $CD4^+CD69^+$ (**A**) e $CD8^+CD69^+$ (**B**) em co-cultura de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=10, FA: n=7, FJ: n=5).

Figura 26A: * $p < 0.05$ em relação ao D8 SE. (Wilcoxon)

Figura 26B: * $p < 0.05$ ao 8º dia SE, **em relação ao CD40L. (Wilcoxon)

6.3- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* são capazes de induzir a expressão de citocinas em linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos

Os resultados anteriores demonstraram que linfócitos T após estimulação com DCs que foram estimuladas com ambas as células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* foram capazes de proliferar e mostraram fenótipo de células ativadas. Nesta etapa verificamos se estes linfócitos T ativados eram capazes de produzir citocinas (IL-2, IL-17, IL-10 e IFN- γ), envolvidas na polarização da resposta imune.

Os linfócitos foram reestimulados com PMA durante 6 horas. Como o PMA inibe a expressão do CD4 na superfície das células, as análises de citometria foram realizadas na população CD3⁺CD8^{neg}.

A estimulação de linfócitos por DCs geradas na ausência de estímulo induziu um pequeno aumento da frequência de células positivas para IL-2, IL-17 e IL-10. Entretanto, observamos um aumento mais expressivo utilizando DCs geradas na presença de células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) e no grupo de pacientes com ambas as formas da doença (FA e FJ), em relação ao grupo controle. (Fig. 27, 28 e 29).

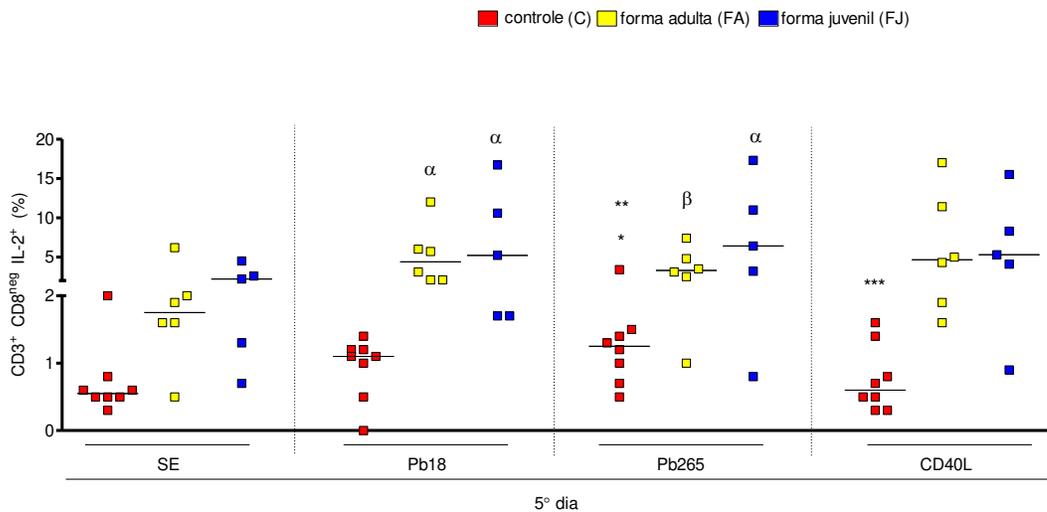


Figura 27: Frequência (%) de células $CD3^+CD8^{neg}IL-2^+$ em co-cultura de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=8, FA: n=6, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE, **em relação ao Pb18, ***em relação ao Pb265. (Wilcoxon)

Comparação entre os grupos Pb18: $\alpha p < 0.05$ FA vs C; **Pb265:** $\beta p < 0.05$ FA vs. C (Mann-Whitney)

Comparação entre os grupos Pb18: $\alpha p < 0.05$ FJ vs C; **Pb265:** $\beta p < 0.05$ FJ vs. C (Mann-Whitney)

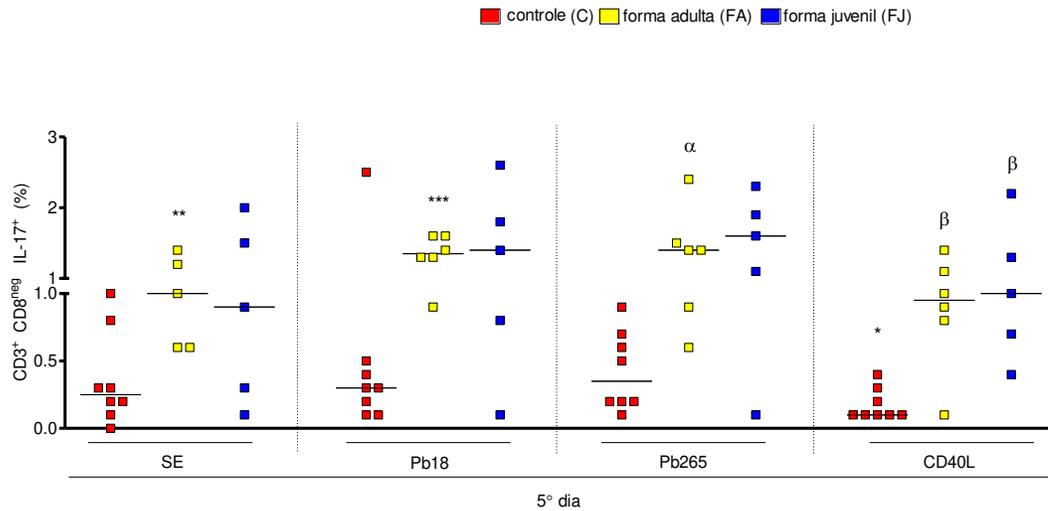


Figura 28: Frequência (%) de células $CD3^+CD8^{neg}IL-17^+$ em co-cultura de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=8, FA: n=6, FJ: n=5).

* $p < 0.05$ em relação ao Pb265 (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos 8º dia SE: ** $p < 0.05$ FA vs C; **Pb18:** *** $p < 0.05$ FA vs. C; **Pb265:** α $p < 0.05$ FA vs. C; **CD40L:** β $p < 0.05$ FA vs. C (Mann-Whitney)

Comparação entre os grupos CD40L: β $p < 0.05$ FJ vs. C (Mann-Whitney)

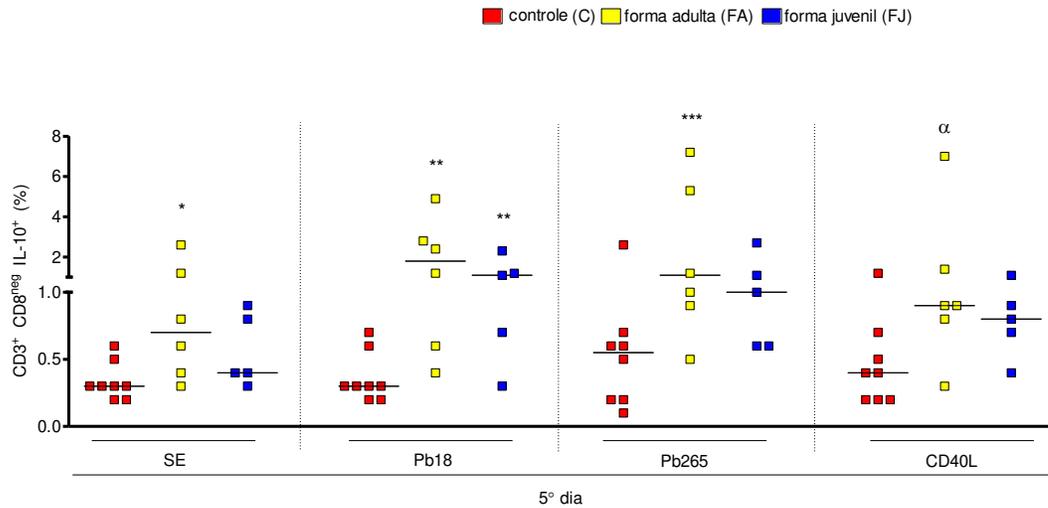


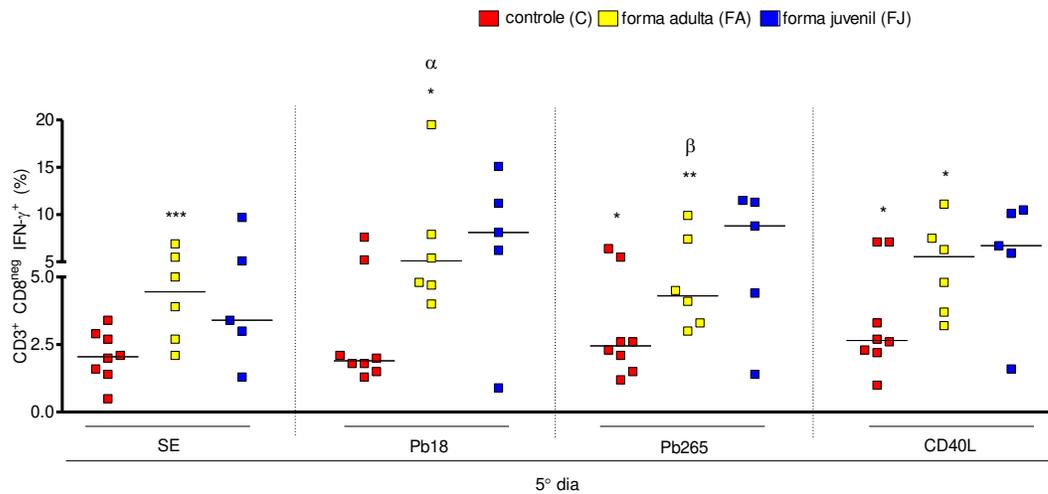
Figura 29: Frequência (%) de células $CD3^+CD8^{neg}IL-10^+$ em co-culturas de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=8, FA: n=6, FJ: n=5).

Comparação entre os grupos 7º dia SE: * $p < 0.05$ FA vs C; **Pb18:** ** $p < 0.05$ FA vs. C; **Pb265:** *** $p < 0.05$ FA vs. C; **CD40L:** α $p < 0.05$ FA vs. C (Mann-Whitney)

Comparação entre os grupos Pb18: ** $p < 0.05$ FJ vs. C (Mann-Whitney)

A frequência de células $CD3^+CD8^{neg}$ para $IFN-\gamma$ foi semelhante em relação às outras citocinas mencionadas acima (fig. 30A). Entretanto, um notável aumento na frequência de células $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ foi demonstrada nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ), sem diferenças entre os grupos (Fig. 30B).

A



B

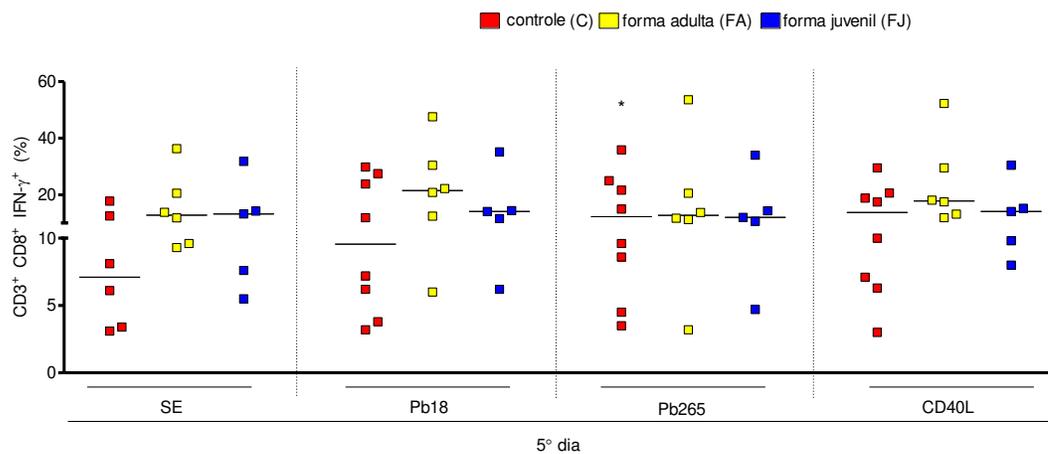


Figura 30: Frequência (%) de células $CD3^+CD8^{neg}IFN-\gamma^+$ (**A**) e $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ (**B**) em co-culturas de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=8, FA: n=6, FJ: n=5).

Figura 30A: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE, ** em relação ao Pb18 (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos da figura 30A: 8º dia SE: *** $p < 0.05$ FA vs C; **Pb18:** α $p < 0.05$ FA vs. C; **Pb265:** β $p < 0.05$ FA vs. C. (Mann-Whitney).

Figura 30B: * $p < 0.05$ em relação ao 8º dia SE (Wilcoxon).

6.4- DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* são capazes de induzir linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos com fenótipo regulatório

Os linfócitos T podem se diferenciar após a devida estimulação em células efectoras antígeno-específicas produtoras de citocinas (Th1, Th2 e Th17) e em linfócito T com fenótipo regulatório (Treg).

DCs que foram estimuladas com ambas as células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* foram capazes de induzir linfócitos com fenótipo de célula T regulatória (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), cuja frequência aumentou após a estimulação com células leveduriformes de ambas as cepas em relação à condição sem estímulo. Verificou-se ainda que o aumento foi mais evidente nos pacientes com a FA em relação ao grupo C (fig. 31A).

A análise da frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi semelhante, mas sem diferenças entre os grupos (fig. 31B).

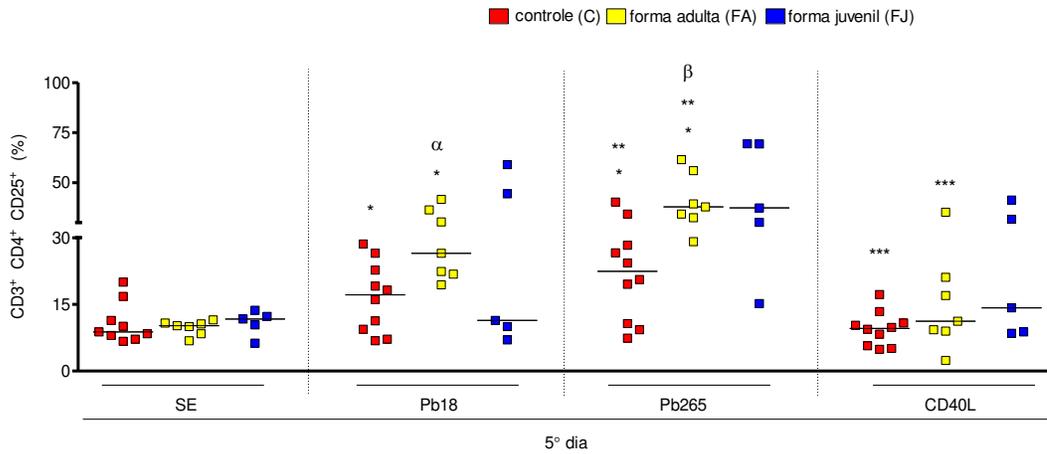
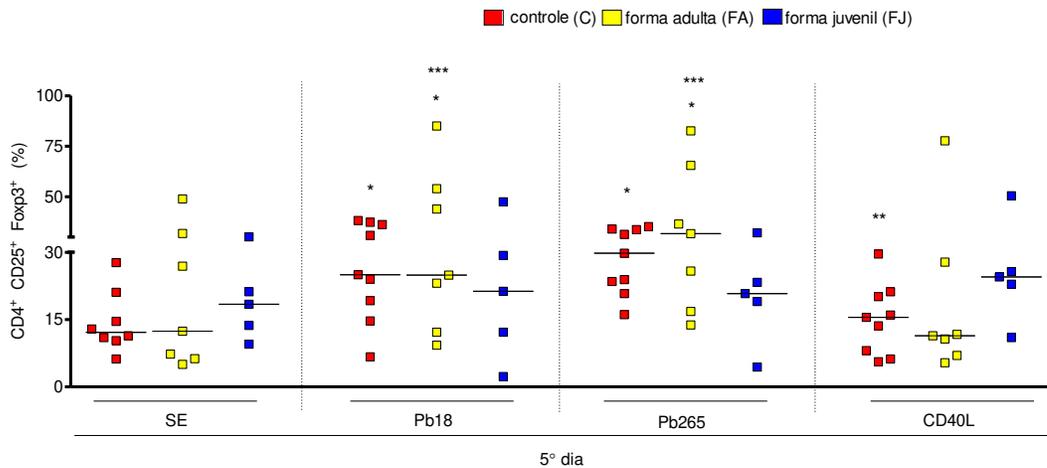
A**B**

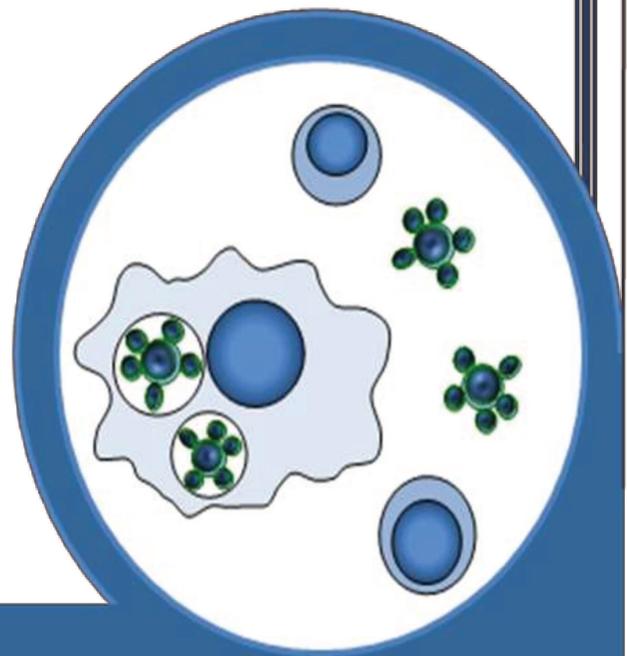
Figura 31: Frequência (%) de células CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (A) e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (B) em co-culturas de células não aderentes e DCs após 5 dias. As DCs foram geradas a partir de monócitos de indivíduos do grupo controle (C), pacientes com a forma adulta (FA) e a forma juvenil (FJ) da PCM cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias, quando então foram estimulados por 18h em cultura com células leveduriformes de Pb18, Pb265, CD40L ou apenas meio de cultura (SE). As linhas horizontais representam a mediana (C: n=10, FA: n=7, FJ: n=5).

Figura 31A: *p < 0.05 em relação ao 8º dia SE, ** em relação ao Pb18, *** em relação ao Pb265 (Wilcoxon).

Comparação entre os grupos da figura 31A: Pb18: α p < 0.05 FA vs C; **Pb265:** β p < 0.05 FA vs. C (Mann-Whitney)

Figura 31B: * em relação ao 8º dia SE, ** em relação ao Pb265, *** em relação ao CD40L. (Wilcoxon)

Discussão



A maturação completa das DCs é necessária para que possa exercer sua função de APC e induzir a resposta imune, com ativação de LT *naive*.

O CD83 é um marcador específico de DCs humanas fenotipicamente competentes, em conjunto com as moléculas coestimulatórias (CD80/CD86/CD40), moléculas HLA-I e HLA-II. Estudos mostram que a expressão de CD83 em DCs aumenta durante a apresentação de antígenos e indução da proliferação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (66,95-97).

Em nosso estudo verificamos que monócitos do sangue periférico dos 3 grupos (C, FA e FJ) foram capazes de se diferenciar em DCs fenotipicamente competentes e funcionais na presença de células leveduriformes de ambas as cepas do fungo *P. brasiliensis*, quando comparado com DCs que não receberam estímulo com as células leveduriformes (7^o SE e 8^o dia SE). Estas células passaram a expressar fenótipo característico de DCs maduras com aumento da expressão do CD83, CD80, CD86 e das moléculas HLA-I e HLA-II, sem diferenças entre os grupos. No entanto foi observado que pacientes com a FA da PCM apresentam uma tendência de maior expressão de CD86, HLA-I e HLA-II em relação ao grupo C e pacientes com a FJ da doença. Além disso, no grupo C houve uma maior expressão de CD83 em DCs estimuladas com as células leveduriformes de Pb265, quando comparado com Pb18, sugerindo que células leveduriformes de baixa virulência induzem uma maturação mais eficiente das DCs.

Embora exista um aumento significativo da expressão das moléculas de co-estimulação acima citadas (CD83, CD80 e CD86) nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ), quando se analisa a MIF os resultados mostram uma diminuição da expressão destes marcadores no grupo de pacientes com a FJ da PCM, em relação aos grupos FA e C. Estes dados podem indicar que na forma mais grave da doença a presença de um número menor de moléculas (CD83/CD80/CD86) na superfície de DCs pode prejudicar sua função APC e por conseguinte a resposta de defesa contra o fungo.

Nossos resultados revelaram que DCs que foram estimuladas com ambas as células leveduriformes do fungo apresentaram uma diminuição da expressão tanto de CD1a como de CD209. Em relação ao CD1a foi demonstrado uma menor expressão desta molécula por DCs que foram estimuladas pela cepa do Pb265, sem

diferenças entre os grupos. No grupo C as células leveduriformes da cepa do Pb265 que induziram uma alta expressão do CD83 e do CD80 também induziram uma diminuição da expressão do CD1a, novamente sugerindo que esta cepa do fungo poderia estar induzindo uma melhor maturação das DCs, em relação as células leveduriformes do Pb18.

A proteína CD1a é expressa em DCs humanas em seu estágio precoce de maturação. Estudos mostraram o envolvimento desta molécula na apresentação de antígenos de origem lipídica para LT e que o microambiente modula a sua expressão em mDCs CD11c⁺, induzindo a geração de DCs CD1a⁺ e CD1a⁻. As mDCs CD1a⁺ são capazes de induzir a produção *in vitro* de grandes quantidades de IL-12p70 e CCL1 (98).

Outra importante molécula de superfície de DCs é o CD209 (DC-SIGN), descrito como um receptor de adesão específico de DCs mielóides diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos CD14⁺ estimulados com GM-CSF e IL-4 capaz de controlar muitas das funções destas células durante a resposta imune. As iDCs e DCs diferenciadas expressam CD209 que interage com o ICAM-3 presente na superfície de linfócitos T. Atuando como um receptor de fagocitose o DC-SIGN pode facilitar a internalização de alguns antígenos solúveis que são processados e apresentados aos linfócitos T junto às moléculas de HLA-I e HLA-II. O CD209 também está envolvido na endocitose de fungos como células leveduriformes de *C. albicans* e conídios de *A. fumigatus* e *Chrysosporium tropicum* (99).

Ambas as cepas de *P. brasiliensis* induzem o aumento da expressão das moléculas de HLA-I e HLA-II, no entanto foi observado um discreto aumento destes marcadores em DCs do grupo de pacientes com a FA da PCM. Estes resultados sugerem que DCs derivadas de monócitos de pacientes com a FA da PCM desenvolvem *in vitro* uma melhor capacidade de apresentação de antígenos para linfócitos T *naive*.

O CCR7 é um receptor de quimiocina expresso na superfície de DCs é adquirido durante o seu processo de maturação. A expressão de CCR7 permite a migração de DCs para os nódulos linfóides, onde ocorre a apresentação de antígenos para linfócitos T *naive*. Nossos resultados em relação a este marcador

mostram um aumento da sua expressão nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ) e preferencialmente dos pacientes com a FA da PCM, que foram estimuladas por Pb265, sugerindo uma ação mais eficaz desta cepa do fungo na indução da maturação das DCs.

A análise da expressão de TLR2 e TLR4 mostrou uma alta expressão destes receptores em DCs dos grupos de pacientes com a FA e FJ da PCM estimuladas por ambas as células leveduriformes do fungo. Foi detectada uma alta frequência de linfócito TLR2⁺ em indivíduos do grupo controle que foram estimuladas pelas células leveduriformes Pb265, indicando uma maior capacidade de ativação das DCs.

Diferentemente, a estimulação com células leveduriformes do fungo induziu uma redução na frequência de células dectina-1⁺ nos grupos C e FJ, em relação às DCs que não receberam estímulos.

DCs estimuladas com CD40L mostraram seu potencial máximo de expressão de praticamente todos os marcadores estudados (CD83, CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD1a, HLA I e II, CCR7, CD209, TLR2 e TLR4), sem diferenças entre os grupos (C, FA, FJ). O CD40L, membro da família do TNF- α , age como um potente estímulo *in vitro* na fase final da cultura celular levando a maturação de DCs de origem mielóide com aumento da expressão das moléculas de co-estimulação, adesão e produção de citocinas inflamatórias.

Uma das características de DCs imaturas é a sua capacidade de captura e processamento de antígenos. Nesta fase, a expressão de moléculas envolvidas na fagocitose é alta, em detrimento daquelas envolvidas na etapa de apresentação de antígeno. Posteriormente, na medida em que se dá a maturação, o processo se inverte e a capacidade de fagocitose diminui. Em nosso estudo analisamos a capacidade de fagocitose de partículas de dextran por DCs de indivíduos do grupo C após a estimulação com células leveduriformes do fungo e CD40L. Os resultados mostraram que ocorre uma significativa diminuição da capacidade fagocítica das DCs, principalmente aquelas que foram estimuladas com Pb265, indicando que a cepa de baixa virulência poderia estar induzindo uma melhor maturação destas células.

Em conjunto, os resultados da análise dos marcadores de superfície mostraram que ambas as células leveduriformes do fungo induziram a maturação das DCs nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ). No entanto a avaliação da expressão da molécula CD83 e da capacidade de fagocitose sugerem que as DCs que foram pulsadas com células leveduriformes da cepa Pb265 do *P. brasiliensis* sofrem um processo de maturação mais eficiente. Isto poderia estar relacionado à maior exposição de β -(1-3) glucana na parede de células leveduriformes com baixa virulência, o que facilitaria o reconhecimento pelos fagócitos. Vários trabalhos mostraram que a atividade fungicida de monócitos humanos é significativamente maior contra as células leveduriformes da cepa Pb265 do que contra a Pb18, que possui maior teor de α -(1-3) glucana em sua parede celular (100).

Posteriormente foi avaliada a expressão do RNAm para citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em DCs 18 horas após o estímulo com as células leveduriformes do fungo. Os resultados revelaram que a estimulação das DCs com as células leveduriformes do fungo induziu o aumento da expressão do RNAm para TNF- α , IL-1 β , IL-12p35 e IL-23p19.

A citocinas são consideradas coordenadoras chave da resposta imune e padrões diferentes de produção podem ser detectados quando ocorre a fagocitose de células leveduriformes, conídios e hifas. A presença dessas citocinas poderia contribuir para uma resposta mais eficaz contra o fungo visto que atuam na promoção da resposta inflamatória, com a estimulação de moléculas de adesão, síntese de quimiocinas e ativação de fagócitos. As citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) produzidas por DCs ativadas induzem a sua maturação e também estão envolvidas na indução da proliferação de linfócitos T CD4 e CD8. A IL-6 induz a expressão do CD25 (receptor para a cadeia α da IL-2) e funciona como um segundo sinal para a indução da produção de IL-2 por linfócitos T. A IL-6 em sinergismo com IL-1 β e TNF- α , induzem o aumento da produção de IL-2 (78).

Alguns trabalhos demonstraram que DCs CD86⁺ apresentam aumento da expressão do RNAm para IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , em resposta ao LPS. A ativação das DCs pela produção de IL-1 β e TNF- α de forma parácrina ou autócrina

representa um importante elo de transição entre a resposta imune inata e a resposta adaptativa. Estes trabalhos demonstraram também que a interação CD40-CD40L induz o aumento da produção de IL-6 e TNF- α por DCs derivadas de monócitos humanos (78).

Em particular, a IL-12 é uma citocina chave que controla a resposta induzida por linfócitos T. APCs como monócitos, macrófagos e células dendríticas produzem IL-12 em resposta à infecção e esta citocina é capaz de, durante o processo de apresentação de antígenos para linfócitos T *naive*, induzir a diferenciação de linfócitos Th1 produtoras de IFN- γ . A IL-12 é composta pelas subunidades p35 e p40 que quando combinadas de forma covalente formam o composto bioativo (IL-12p70). Alguns trabalhos sugerem que a presença da subunidade da IL-12p35 é imprescindível para a indução da diferenciação de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ . DCs que foram estimuladas com LPS perdem a capacidade de induzir a diferenciação de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ quando a subunidade da IL-12p35 foi neutralizada (78,101).

A IL-23 também é uma citocina produzida por DCs na forma heterodimérica que promove um *link* entre a resposta imune inata e adquirida, sendo produzida precocemente em resposta a patógenos. A IL-23 é produzida por macrófagos ativados e DCs sendo composta pelas subunidades p40 da IL-12 e pela IL-23p19 que é homóloga a IL-12p35. A IL-23, em sinergismo com a IL-1 β e IL-6, parece ter um importante papel na indução da diferenciação de linfócitos Th17 (81,101). Similarmente a IL-12p70, a IL-23 também induz a produção de IFN- γ por linfócitos T humanos de memória (CD45RO⁺), embora em menor quantidade (78). A IL-23 induz a expansão de linfócitos T de memória (CD4⁺/CD45RO⁺) e a diferenciação de linfócitos Th17 produtores de IL-17 (102).

Em nosso estudo a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-23p19 por DCs estimuladas por células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265) poderia estar induzindo a diferenciação de linfócitos T *naive* em Th17 produtores de IL-17 e a produção de IL-12p35/p40 a diferenciação em linfócitos Th1 CD4⁺/CD45RO⁺ produtores de IFN- γ , como posteriormente demonstramos pela análise das populações de linfócitos por citometria de fluxo.

Alguns estudos mostraram que fungos patogênicos como *Histoplasma capsulatum* portador de β -(1-3) glucana em sua parede induzem DCs, via dectina-1, a produzir IL-23 levando a diferenciação de linfócitos Th17 (103). Por outro lado, a presença das subunidades da IL-12 (p40/p35) também pode induzir a diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos Th1 produtores de IFN- γ , como verificado em estudos com DCs infectadas com *Aspergillus fumigatus* (93).

Em nosso trabalho foi observada uma baixa expressão de RNAm para dectina-1 em DCs estimuladas com células leveduriformes Pb265 nos pacientes com a FA da PCM (dados não mostrados), compatível com os resultados de citometria de fluxo que mostraram uma redução das células dectina-1+. Diferentemente, observamos uma alta frequência de linfócito TLR2⁺ e TLR4⁺ avaliadas por citometria de fluxo, após a estimulação com células leveduriformes do fungo nos pacientes com as duas formas clínicas da PCM.

Vários trabalhos sugerem que a dectina-1 altamente expressa em DCs age em sinergismo com TLRs; promovendo assim uma exacerbada resposta inflamatória com produção de IL-12 e TNF- α (104,105). O reconhecimento de β -(1,3) glucana pela dectina-1 é uma das principais vias de reconhecimento de fungos e camundongos deficientes neste receptor são mais suscetíveis à infecção por *Candida albicans* e *Pneumocystis jiroveci* (41). O TLR2 e TLR4 também estão envolvidos no reconhecimento de *C. albicans* induzindo a produção de citocinas inflamatórias (106). Recentemente demonstramos a participação do TLR-2, TLR-4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização do *Paracoccidioides brasiliensis* por monócitos e neutrófilos humanos e ativação da resposta imunológica ao fungo (16).

As β -(1,3) glucanas são reconhecidas por células do sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos e DCs) portadoras de dectina-1, modulando assim a resposta imune do hospedeiro (44). Este reconhecimento é fundamental para a imunidade anti-fúngica. Além do reconhecimento das β -(1,3) glucanas, outros trabalhos mostraram em humanos que a dectina-1 pode funcionar como uma molécula co-estimulatória para linfócito T (44). Diferente dos TLRs que induz uma resposta Th1; a dectina-1 induz a produção de IL-23 e IL-6 polarizando a resposta imune adaptativa para linfócito Th17 (31).

Em relação à produção das citocinas anti-inflamatórias verificamos expressão do RNAm para IL-10 em DCs estimuladas por células leveduriformes do Pb265 somente nos grupos FA e FJ. Por outro lado, foi observada expressão do RNAm para TGF- β em DCs estimuladas por ambas células leveduriformes do fungo somente no grupo com a FA da doença.

Com base na análise da expressão gênica pudemos constatar que as DCs dos 3 grupos estudados (C, FA, FJ) diferenciadas *in vitro* constituem uma população heterogênea capaz de produzir citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-12p35/p40, IL-6 e IL-23) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β).

Posteriormente verificamos a capacidade das DCs geradas após a estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis* em ativar linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ autólogos.

DCs que foram estimuladas com ambas as cepas do fungo (Pb18 e Pb265) foram capazes de induzir uma maior proliferação de linfócitos T autólogos (CD4⁺/CD8⁺) nos grupos de pacientes com FA e FJ da PCM, em relação ao grupo C. Este resultado foi concordante com o achado de aumento da frequência de linfócito T de memória (CD4⁺/CD45RO⁺ e CD8⁺/CD45RO⁺) nos pacientes com a doença.

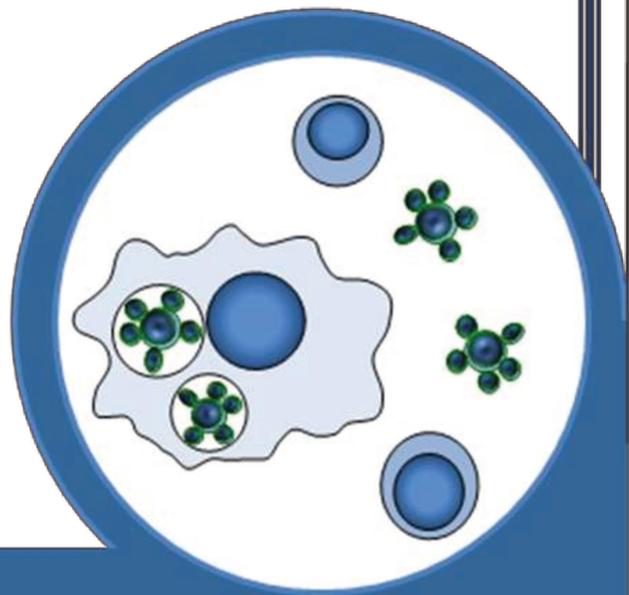
Observamos também um aumento da frequência de células CD4⁺/CD69⁺ e CD8⁺/CD69⁺ em linfócitos que foram estimulados com DCs pulsadas com as ambas as células leveduriformes do fungo (Pb18 e Pb265), principalmente nos pacientes com a FA da PCM, quando comparado com o grupo controle. O CD69 é um receptor de superfície expresso em leucócitos durante sua ativação após infecção por microrganismos patogênicos (107). *In vivo* este receptor é encontrado em infiltrados leucocitários durante os processos inflamatórios crônicos. Nossos resultados sugerem que as DCs pulsadas com o fungo adquiriram competência para ativar linfócitos T autólogos, levando a sua diferenciação em células efetoras. Alguns estudos sugerem que o CD69 também possui uma função pro-inflamatória podendo agir como uma molécula regulatória modulando assim a resposta imune (107). Durante a infecção intracelular por *Listeria monocytogenes* o CD69 pode também controlar a ativação de linfócitos Th1 e a produção de citocinas, controlando assim o número de células efetoras ativadas (108).

Por outro lado, observamos que as células leveduriformes do fungo também induziram a proliferação de linfócitos T com fenótipo regulatório (CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺) nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ), em relação à condição SE.

A pesquisa de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4⁺ (T CD3⁺ CD8^(neg)) demonstrou que a DCS estimuladas com ambas cepas do fungo foram capazes de induzir a produção de IL-2, IFN- γ e IL-17 e IL-10 de forma mais acentuada pelos grupos de pacientes com PCM, sem diferença entre as formas clínicas. Já a produção de IFN- γ por linfócitos T CD3⁺CD8⁺ foi similar nos 3 grupos estudados (C, FA, FJ).

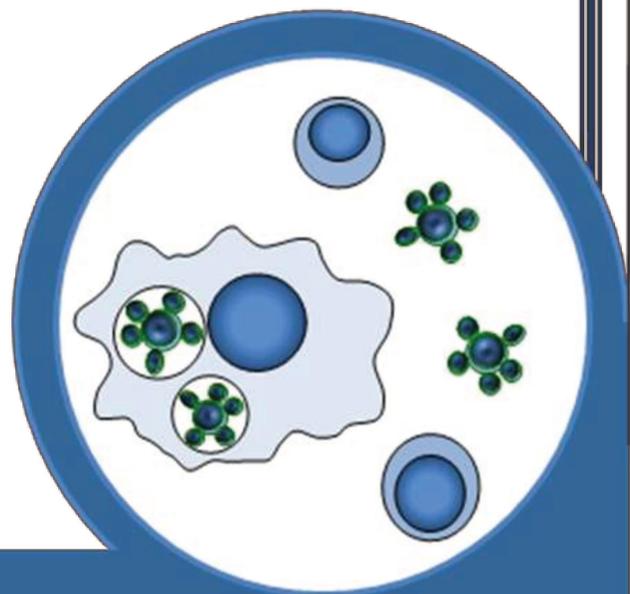
Em conjunto os resultados do estudo mostraram que a estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) induz uma população heterogênea de DCs capazes de produzir citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e dar origem a uma resposta linfocitária mista com proliferação de linfócito Th1 (produtoras de IFN- γ), Th17 (produtoras de IL-17) e células com fenótipo regulatório Foxp3⁺ (produtoras de IL-10). Estes linfócitos T polifuncionais produtores de IFN- γ e IL-17 poderiam estar sendo ativados por meio da β -(1,3) glucana, presente em maior quantidade nas leveduras da cepa de baixa virulência (Pb265).

Conclusão



Em conjunto os resultados do estudo mostraram que a estimulação com células leveduriformes das cepas Pb265 (baixa virulência) e Pb18 (alta virulência) de *P. brasiliensis* induz uma população heterogênea de DCs capazes de produzir citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e dar origem a uma resposta linfocitária mista com proliferação de linfócitos Th1 (produtores de IFN- γ), Th17 (produtores de IL-17) e células com fenótipo regulatório Foxp3⁺ (produtores de IL-10). Estes linfócitos T polifuncionais produtores de IFN- γ e IL-17 poderiam estar sendo ativados por meio da β -(1,3) glucana presente em maior quantidade na parede celular das células leveduriformes da cepa Pb265.

Referências Bibliográficas



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbosa W, Barbosa GL. Paracoccidioidomycosis--a disease of the phagocytic mononuclear system. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1991; 24 (4): 203-7.
2. Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis. *Paediatr Respir Rev.* 2009; 10 (4): 161-5.
3. Wanke B, Aide MA. Chapter 6--paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol.* 2009; 35 (12): 1245-9.
4. Andrade RV, Paes HC, Nicola AM, de Carvalho MJ, Fachin AL, Cardoso RS et al. Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics.* 2006; 7: 208.
5. Andrade RV, Da Silva SP, Torres FA, Pocas-Fonseca MJ, Silva-Pereira I, Maranhao AQ et al. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Iberoam Micol.* 2005; 22 (4): 203-12.
6. Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* 2006; 6 (5): 344-51.
7. Coutinho ZF SD, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2002; 18 (5): 1441-54.
8. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 2002; 10 (2): 80-7.
9. Pereira M, Felipe MS, Brigido MM, Soares CM, Azevedo MO. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 2000; 16 (5): 451-62.
10. Klein BS, Tebbets B. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10 (4): 314-9.
11. Mendes-Giannini MJ, Monteiro da Silva JL, de Fatima da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia.* 2008; 165 (4-5): 237-48.
12. Cacere CR, Mendes-Giannini MJ, Fontes CJ, Kono A, Duarte AJ, Benard G. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1 and ICOS on T-cells from paracoccidioidomycosis patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol.* 2008; 129 (2): 341-9.
13. Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology.* 1994; 140 (Pt 5): 1189-94.

14. Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol.* 1993; 93 (2): 189-94.
15. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* 1977; 62 (2): 77-86.
16. 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 (7): 722-33.
17. Ameen M, Talhari C, Talhari S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35 (6): 576-80.
18. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008; 165 (4-5): 209-21.
19. Shikanai-Yasuda MA TFF, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e Grupo de Consultores do Concenso de Paracoccidioidomicose Consenso em paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2006; 39 (3): 297-310.
20. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4 (2): 139-44.
21. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2002; 40 (2): 153-9.
22. Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65 (3): 237-41.
23. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine.* 2005; 32 (1): 20-9.
24. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2006; 35 (3-4): 207-16.
25. Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2003; 21 (5): 234-41.
26. Fornazim MC, Balthazar A, Quagliato R, Jr., Mamoni RL, Garcia C, Blotta MH. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J.* 2003; 22 (6): 895-9.
27. Burlandy-Soares LC, Mamoni RL, Lyra L, Schreiber AZ, Blotta MH. Expression of activation and cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes of patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2010; 48 (6): 843-52.
28. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of

- patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 2010; 78 (10): 4392-401.
29. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997; 91 (3): 295-8.
 30. Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia.* 2008; 165 (4-5): 223-36.
 31. Zak DE, Aderem A. Systems biology of innate immunity. *Immunol Rev.* 2009; 227 (1): 264-82.
 32. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010; 327 (5963): 291-5.
 33. Chai LY, Netea MG, Vonk AG, Kullberg BJ. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol.* 2009; 47 (3): 227-36.
 34. Sabatte J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18 (1-2): 5-17.
 35. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003; 299 (5609): 1033-6.
 36. Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity.* 2004; 21 (5): 733-41.
 37. Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 53 (1): 1-7.
 38. Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2009; 183 (2): 1279-90.
 39. Loures FV, Pina A, Felonato M, Araujo EF, Leite KR, Calich VL. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun.* 2010; 78 (3): 1078-88.
 40. Acorci-Valerio MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, de Campos Soares AM. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol.* 2010; 71 (2): 99-108.
 41. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007; 8 (1): 31-8.
 42. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18 (4): 465-72.
 43. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (1): 33-43.
 44. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 2009; 230 (1): 38-50.

45. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010; 234 (1): 45-54.
46. Pereira SR, Faca VM, Gomes GG, Chammas R, Fontes AM, Covas DT et al. Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide. *Proteomics.* 2005; 5 (5): 1186-98.
47. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010; 327 (5966): 656-61.
48. Kvistborg P, Boegh M, Pedersen AW, Claesson MH, Zocca MB. Fast generation of dendritic cells. *Cell Immunol.* 2009; 260 (1): 56-62.
49. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* 2007; 26 (6): 741-50.
50. Bar-On L, Jung S. Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunol Rev.* 2010; 234 (1): 76-89.
51. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 275-306.
52. Blasius AL, Colonna M. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol.* 2006; 27 (6): 255-60.
53. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 669-92.
54. Conti L, Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology.* 2008; 213 (9-10): 859-70.
55. Romani L, Mencacci A, Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Wolf S et al. Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. *Eur J Immunol.* 1994; 24 (4): 909-15.
56. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994; 179 (4): 1109-18.
57. Romani L, Puccetti P, Mencacci A, Spaccapelo R, Cenci E, Tonnetti L et al. Tolerance to staphylococcal enterotoxin B initiated Th1 cell differentiation in mice infected with *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1994; 62 (9): 4047-53.
58. Romani L, Mencacci A, Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Puccetti P et al. IL-12 is both required and prognostic in vivo for T helper type 1 differentiation in murine candidiasis. *J Immunol.* 1994; 153 (11): 5167-75.
59. Schmid MA, Kingston D, Boddupalli S, Manz MG. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev.* 2010; 234 (1): 32-44.
60. Coquerelle C, Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev.* 2010; 234 (1): 317-34.

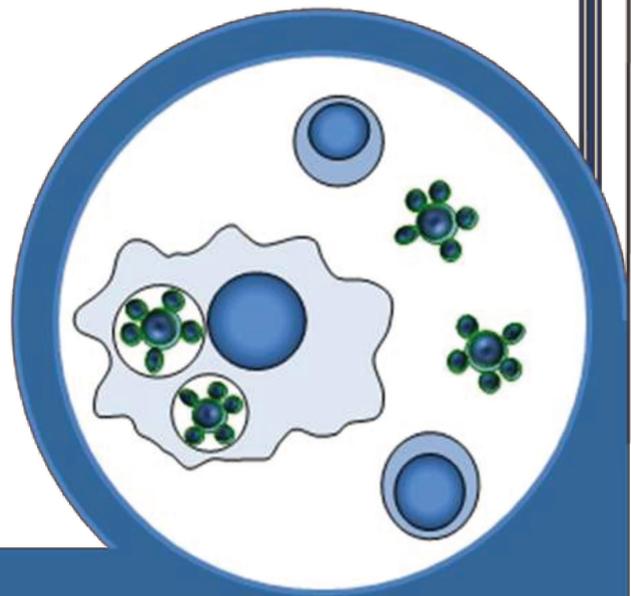
61. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999; 99 (1): 23-33.
62. Jin P, Han TH, Ren J, Saunders S, Wang E, Marincola FM et al. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. 2010; *J Transl Med*. 8: 4.
63. Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*. 2004; 16 (11): 1201-10.
64. Mackay CR, Sallusto F. A new role for CCR5 in innate immunity--binding to bacterial heat shock protein 70. *Eur J Immunol*. 2006; 36 (9): 2293-5.
65. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010; 234 (1): 45-54.
66. Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. 2005; 114 (2): 204-12.
67. Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*. 2006; 117 (4): 443-51.
68. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (6): 476-83.
69. Pasquier B, Lepelletier Y, Baude C, Hermine O, Monteiro RC. Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2004; 76 (6): 1134-41.
70. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000; 100 (5): 575-85.
71. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001; 194 (12): 1823-34.
72. Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*. 2001; 276 (47): 43818-23.
73. Ryan EJ, Marshall AJ, Magaletti D, Floyd H, Draves KE, Olson NE et al. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *J Immunol*. 2002; 169 (10): 5638-48.
74. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*. 2002; 17 (3): 353-62.
75. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*. 2002; 23 (9): 445-9.

76. Repnik U, Bergant M, Wraber B, Jeras M. Late dendritic cells are still able to evoke a potent alloreactive CTL response. *Immunobiology*. 2008; 213 (1): 51-64.
77. Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*. 2002; 195 (1): 15-21.
78. Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT, Colvin BL, Logar AJ, Takayama T et al. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood*. 2001; 98 (5): 1512-23.
79. Granucci F, Vizzardelli C, Virzi E, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol*. 2001; 31 (9): 2539-46.
80. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 2008; 205 (5): 1063-75.
81. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*. 2009; 7: e003.
82. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7 (4): 305-10.
83. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med*. 2000; 191 (3): 435-44.
84. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scand J Immunol*. 2003; 58 (3): 290-7.
85. Almeida SR, Lopes JD. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34 (4): 529-37.
86. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett*. 2004; 94 (1-2): 107-14.
87. Ferreira KS, Almeida SR. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *Immunol Lett*. 2006; 103 (2): 121-6.
88. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis*. 2007; 196 (7): 1108-15.
89. Xia Y, Dai J, Lu P, Huang Y, Zhu Y, Zhang X. Distinct effect of CD40 and TNF-signaling on the chemokine/chemokine receptor expression and function of the human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Mol Immunol*. 2008; 5 (2): 121-31.

90. Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Stringaro A, Crateri P, Mariotti S et al. *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infect Immun*. 2004; 72 (2): 833-43.
91. Bufan B, Mojsilovic S, Vucicevic D, Vucevic D, Vasilijic S, Balint B et al. Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9 (7-8): 910-7.
92. Duperrier K, Eljaafari A, Dezutter-Dambuyant C, Bardin C, Jacquet C, Yoneda K et al. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J Immunol Methods*. 2000; 238 (1-2): 119-31.
93. Gafa V, Lande R, Gagliardi MC, Severa M, Giacomini E, Remoli ME et al. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun*. 2006; 74 (3): 1480-9.
94. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*. 2000; 95 (1): 286-93.
95. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*. 2007; 37 Suppl 1: S9-17.
96. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*. 2007; 37 (3): 686-95.
97. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*. 2005; 385 (Pt 1): 85-93.
98. Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L et al. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood*. 2007; 109 (2): 643-52.
99. Geijtenbeek TB, Engering A, Van Kooyk Y. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol*. 2002; 71 (6): 921-31.
100. Calvi SA, Peracoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect*. 2003; 5 (2): 107-13.
101. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009; 8 (1): 40-52.
102. Tan ZY, Bealgey KW, Fang Y, Gong YM, Bao S. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41 (4): 733-5.

103. Chamilos G, Ganguly D, Lande R, Gregorio J, Meller S, Goldman WE et al. Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. *PLoS One*. 2010; 5 (9): e12955.
104. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol*. 2008; 10 (10): 2058-66.
105. Calugaru A, Cremer L, Lupu AR, Badulescu MM, Apetrei NS, Moscovici M et al. Recognition and modulation of Dectin-1 and TLR-2 receptors by curdlan derivatives and purified natural extracts. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2009; 68 (3): 119-24.
106. Gil ML, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci*. 2009; 14: 570-82.
107. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 2005; 26 (3): 136-40.
108. Vega-Ramos J, Alari-Pahissa E, Valle JD, Carrasco-Marin E, Esplugues E, Borrás M et al. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol Cell Biol*. 2010; 88 (7): 707-15.
109. Ni L, Gayet I, Zurawski S, Duluc D, Flamar AL, Li XH et al. Concomitant activation and antigen uptake via human Dectin-1 results in potent antigen-specific CD8⁺ T cell responses. *J Immunol*. 2010; 185 (6): 3504-13.

Anexos



VIII. ANEXOS

Anexo 1: Características dos pacientes com a FA da PCM (n=15)

Paciente	Idade	Tabagismo/ Etilismo	Profissão	Sintomas clínicos	Localização	Diagnóstico	Sorologia (ID)
JLJ	50	Sim/Sim	Pedreiro	Rouquidão, coriza, tosse com secreção	Pulmões e mucosas	Biópsia língua	1/1
GJC	50	Sim/Não	Pedreiro	Rouquidão, tosse seca dispnéia	Pulmões, laringe e mucosa oral	Biópsia epiglote e borda língua	1/2
CFP	49	Sim/Não	manicure	Dor abdominal e tosse	Pulmões e pele	Biópsia região maxilar e escarro	1/2
SLSS	43	Sim/Sim	agricultor	Perda peso e apetite tosse seca, dispneia	Pulmões	Exame direto escarro	1/4
JCS	65	Sim/Sim	metalúrgico	Rouquidão, tosse com secreção	Pulmões, laringe e pele	Biópsia lesão axila	1/2
JCF	48	Sim/Sim	agricultor	Rouquidão e tosse	Pulmões e laringe	-	não reagente
APS	49	Sim/Não	agricultor	Efisema pulmonar e lesões pele	Pulmões	Biópsia lesão palato e orofaringe	1/2
BDA	54	Sim/Não	caseiro	Perda peso, febre, tosse seca e dispneia	Pulmões, mucosa oral	Biópsia cavidade oral	1/1
JBC	55	Sim/Não	pedreiro	Lesões cutâneas, tosse seca	Pulmões, mucosa oral e pele	Biópsia lesões cutâneas	1/4
ABVAS	61	Sim/Não	eletricista	Dispneia, tosse seca	Pulmões	-	1/4
JRA	46	Sim/Sim	agricultor	Lesão língua	Pulmões, mucosa oral	Biópsia borda língua	1/4
MR	39	Não/Não	mecânico	Dispneia, tosse seca	Pulmões e laringe	Biópsia orofaringe e palato	não reagente
PR	57	Sim/Sim	agricultor	Tosse seca, rouquidão, perda peso	Pulmões e laringe	Biópsia de laringe	não reagente
LBP	55	Sim/Sim	motorista	Lesão cavidade oral, perda peso	Pulmões e orofaringe	Biópsia de cavidade oral	1/8
DEFF	60	Sim/Sim	Dona de casa	Tosse seca, coriza, lesões na cavidade oral	Pulmões e mucosas	Biópsia lesões cavidade oral	1/1

Anexo 2: Características dos pacientes com a FJ da PCM (n=12)

Paciente	Idade	Tabagismo/ Etilismo	Profissão	Sintomas clínicos	Localização	Diagnóstico	Sorologia (ID)
LFF	33	Não/Não	tecelagem	Febre diária, tosse seca, perda peso	Linfonodos	Biópsia gânglio e escarro +	1/8
RJPB	7	Não/Não	-	Febre diária, Inapetência, dor abdominal	Linfonodos	Biópsia gânglio	1/64
TCSJ	9	Não/Não	-	Febre diária, septicemia, insuficiência renal	Linfonodos	Biópsia mucosa nasal	1/64
MGM	12	Não/Não	-	Febre diária, sudorese, lesões pele	Linfonodos, pele	Biópsia pele e fragmento hepático	1/32
MOS	10	Não/Não	-	Febre diária, edema joelho, perda peso	Linfonodos	-	1/32
JSS	26	Sim/Não	pedreiro	Febre diária, diarréia, dor abdominal	Linfonodos	Biópsia apêndice cervical	1/32
SGCG	24	Não/Não	-	Diarréia, dor abdominal, tosse produtiva	Linfonodos, pele	Biópsia gânglio	1/8
CSS	7	Não/Não	-	Febre diária, fratura de tornozelo	Linfonodos , ossos	Biópsia óssea	1/32
PMDR	29	Não/Não	-	Múltiplos linfonodos cervicais	Linfonodos	-	1/4
WCPS	13	Não/Não	-	-	Linfonodos	-	1/32
RLGS	33	Não/Não	faxineira	Febre diária, perda peso, tosse, dor abdominal	Linfonodos	Biópsia linfonodo	1/64
ICP	19	Não/Não	Lavoura café	Múltiplos linfonodos cervicais e fraqueza	Linfonodos	Biópsia linfonodo	1/64

Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM - UNICAMP

	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
	www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
CEP, 25/07/06. (Grupo III)	
PARECER PROJETO: Nº 263/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) CAAE: 0195.0.146.000-06	
I-IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS HUMANAS INDUZIDAS POR DUAS CEPAS DE PARACOCCIDIOIDES COM POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DIVERSO" PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Márcia Cristina Fornazim INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/06/2006 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/07/07 (O formulário encontra-se no site acima)	
II - OBJETIVOS	
Verificar o potencial dos lisados de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> em promover a diferenciação de células dendríticas imaturas em células maduras competentes, em seus aspectos fenotípicos e funcionais.	
III - SUMÁRIO	
Serão cultivadas células aderentes de sangue periférico de 5 indivíduos normais saudáveis, que não entraram em contato com o fungo e negativos para o teste cutâneo; 10 pacientes com PCM, com diagnóstico comprovado, divididos de acordo com a forma clínica da doença, a saber: 5 para a forma juvenil e 5 para a forma adulta; e 5 indivíduos infectados, mas não doentes. As células dendríticas serão caracterizadas pelos seus marcadores e posteriormente pela dosagem de citocinas. Os dados serão analisados através de testes não paramétricos.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES	
A hipótese está clara e os métodos aplicados às amostras atenderão aos objetivos do estudo. Termo de Consentimento adequado.	
V - PARECER DO CEP	
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.	
Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Cidade Postal 6111 13084-971 - Campinas - SP	FONE (019) 3788.4936 FAX (019) 3788.7187 cep@fcm.unicamp.br
- 1 -	



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de julho de 2006.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 4: Termo de consentimento

Nome do Estudo: Caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas humanas induzidas por duas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* com potencial de virulência diverso

Pesquisador Principal: Márcia Cristina Fornazim

Supervisora: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Local: Hospital das Clínicas - Unicamp

Nome do Paciente: _____

Cidade: _____ RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Contatos:

Márcia Cristina Fornazim – (19) 3521-8991 – (19) 3521-9056 – (19) 3406-5049 – (19) 9230-5877

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta – (19) 3521-9453 – (19)3287-6531 – (19) 9798-7660

Objetivos do Estudo:

Nós pedimos a permissão de incluir o (a) senhor (a) como participante de um protocolo de pesquisa. O objetivo deste estudo é verificar se as células que serão obtidas do seu sangue periférico podem ou não ser ativadas *in vitro*; ou seja se estas células de defesa do seu sangue conseguem ou não combater o fungo e conter a doença chamada de paracoccidioidomicose. Por meio desta coleta de sangue responderemos algumas questões referentes à fase inicial da doença. A paracoccidioidomicose é uma doença causada por um fungo, muito comum no Brasil, e que é ainda pouco estudada. Portanto estamos fazendo um estudo para tentar compreender como este fungo causa a doença e como as células de defesa do doente reagem contra ele.

Procedimentos:

Neste estudo colheremos uma amostra de sangue para a qual realizaremos todos os testes que necessitamos. Não será feita nenhuma punção extra além desta. Apenas colheremos uma pequena quantidade (100 mL) de sangue. O senhor não terá nenhuma despesa. Seu tratamento neste hospital não será alterado em nada: não serão adicionados ou retirados medicamentos e todos os outros procedimentos ocorrerão sem nenhuma interferência.

Riscos e Desconfortos:

Nenhum risco maior ou desconforto ocorrerá devido ao estudo. A punção venosa ocorrerá como de costume e serão coletados apenas um volume (100mL – ¼ do volume de uma bolsa de doação de sangue), resultando em uma extensão mínima do tempo de retirada do sangue.

Recusa de Participação ou Retirada do Estudo:

A participação neste estudo é voluntária. Você não tem nenhuma obrigação de participar deste estudo. Seu tratamento atual ou futuro não será afetado em caso de você não participar do estudo. Se você decidir participar, você poderá mudar de opinião e sair do estudo a qualquer momento sem que isto afete seu tratamento atual ou futuro neste hospital.

Confidencialidade:

Informações médicas obtidas neste estudo não farão parte do seu prontuário médico deste hospital e serão colocadas junto a arquivo dos investigadores. O prontuário médico fica à disposição de médicos do complexo hospitalar do Hospital das Clínicas da Unicamp e quem tiver acesso a ele deverá manter a confidencialidade de acordo com as leis e política do hospital. Nenhuma informação será distribuída a pessoas fora do hospital sem seu consentimento prévio, a não ser em casos previstos neste termo de consentimento.

Informações do seu prontuário poderão eventualmente serem disponibilizados a órgãos governamentais no cumprimento de seu dever legal de zelar pela ética na pesquisa médica.

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas ou livros médicos e serem usados para o ensino. Porém, seu nome e outros identificadores não serão usados em nenhum momento sem a sua devida permissão.

Requerimento de Maiores Informações

Você pode fazer novas perguntas sobre o estudo a qualquer momento. Os investigadores vão dar a você números de telefone e estarão disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas.

Se durante o estudo ou após você desejar discutir seus direitos como participante do grupo de estudo, tiver qualquer reclamação ou se sentir pressionado para participar do estudo ou para continuar nele, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp no telefone (19) 3521-8936.

Assinatura:

Eu confirmo que o objetivo do estudo, seus procedimentos e os possíveis riscos e desconfortos que eu possa experimentar foram explicados para mim. Alternativas a minha participação também foram discutidas. Todas as minhas questões foram respondidas. Eu li ou leram para mim este termo de consentimento. Minha assinatura abaixo indica minha inclusão no estudo.

Paciente: _____

Data: _____

Testemunha: _____

Atesto que expliquei o objetivo do estudo, seus procedimentos, identificando quais seriam investigativos, os possíveis riscos e desconfortos e respondi a todas as questões a respeito do estudo na melhor de minhas habilidades.

Representante do Estudo: _____

Data: _____

Anexo 5

Recuperação da fração de CMSP, fração aderente e DCs 7º dia

Monócitos obtidos por aderência a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 16 indivíduos normais saudáveis (grupo controle [C]; sendo 7 do sexo masculino e 9 sexo feminino), de 15 indivíduos do grupo de pacientes portadores da forma adulta da doença (FA) [sendo 13 do sexo masculino e 2 sexo feminino] e 12 indivíduos do grupo de indivíduos portadores da forma juvenil (FJ) [sendo 5 do sexo masculino e 7 sexo feminino], foram cultivadas *in vitro* na presença de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SVF), 2% L-glutamina, 1% piruvato de sódio, 0,2% de antibióticos (penicilina e streptomina), rhGM-CSF (800 UI/mL ou 100ng/mL) e rhIL-4 (500 UI/mL ou 5ng/mL) em frascos de 75mL, durante 7 dias consecutivos. No 2º e 5º dia após o início da cultura as células aderentes foram enriquecidas com citocinas frescas, sem a troca de meio de cultura.

As tabelas abaixo demonstram os valores de 16 indivíduos controles (Tabela 1), 15 pacientes portadores da forma adulta (Tabela 2) e 12 pacientes com a forma juvenil da doença (Tabela 3): volume de sangue periférico coletado, número de células obtida após a separação pelo gradiente de separação *Ficoll Hypaque*, fração de células obtidas após aderência em plástico, recuperação e a porcentagem (%) de iDCs após 7 dias de cultura com rhGM-CSF e rhIL-4 em relação a fração aderente inicial.

Tabela 1: Recuperação das frações celulares a partir do sangue periférico do grupo controle (C).

No.	Volume Sangue mL	Células (x10 ⁶) linfomononucleares	Fração (x10 ⁶) Aderente	(x10 ⁶) D7 iDCs	% D7 iDCs
1	160	259	111	13,6	11,7
2	100	215	117	13,7	11,7
3	100	154	90	6,2	6,8
4	100	184,5	103,5	9,95	9,25
5	150	203,1	105,4	10,86	9,8
6	100	193,8	104,4	10,40	9,5
7	120	175	98	5	5,1
8	100	106	63	6	9,5
9	100	164	69	2,75	3,9
10	100	107	66	7,5	11
11	100	89	68	19	28
12	100	126	56	5,2	9,2
13	100	117	51	2,5	4,9
14	100	103	58	2,7	4,6
15	100	144	36	3,4	9,4
16	100	106	33	8,7	26
Média	108	153	77	7,9	10,6

Tabela 2: Recuperação das frações celulares a partir do sangue periférico do grupo de pacientes portadores da forma adulta (FA).

No.	Volume Sangue mL	Células (x10 ⁶) linfomononucleares	Fração (x10 ⁶) Aderente	(x10 ⁶) D7 iDCs	% D7 iDCs
JLJ	50	29,6	21,4	0,65	3
GJC	40	99	35	3,25	9,2
CFP	40	118	70	6,3	9
SLSS	40	111	66	4,4	2,9
JCS	40	84	49,5	1,87	3,8
JCF	40	72	37	9,12	24,6
APS	40	42,6	11,4	2,4	21
BDA	40	119	41	11	26,8
JBC	40	32	15	1,28	8,5
ABVS	40	59,6	26,1	10,0	38,3
JRA	40	66,7	33,2	4,5	13,4
MR	40	54	30,0	5,0	16,6
PR	40	47,0	7,0	2,7	38,5
LBP	40	66,0	50,0	7,4	14,8
DEFF	40	62,0	38,5	3,5	9,0
Média	40,6	70,8	35,4	4,89	15,5

Tabela 3: Recuperação das frações celulares a partir do sangue periférico do grupo de pacientes com forma juvenil da doença (FJ).

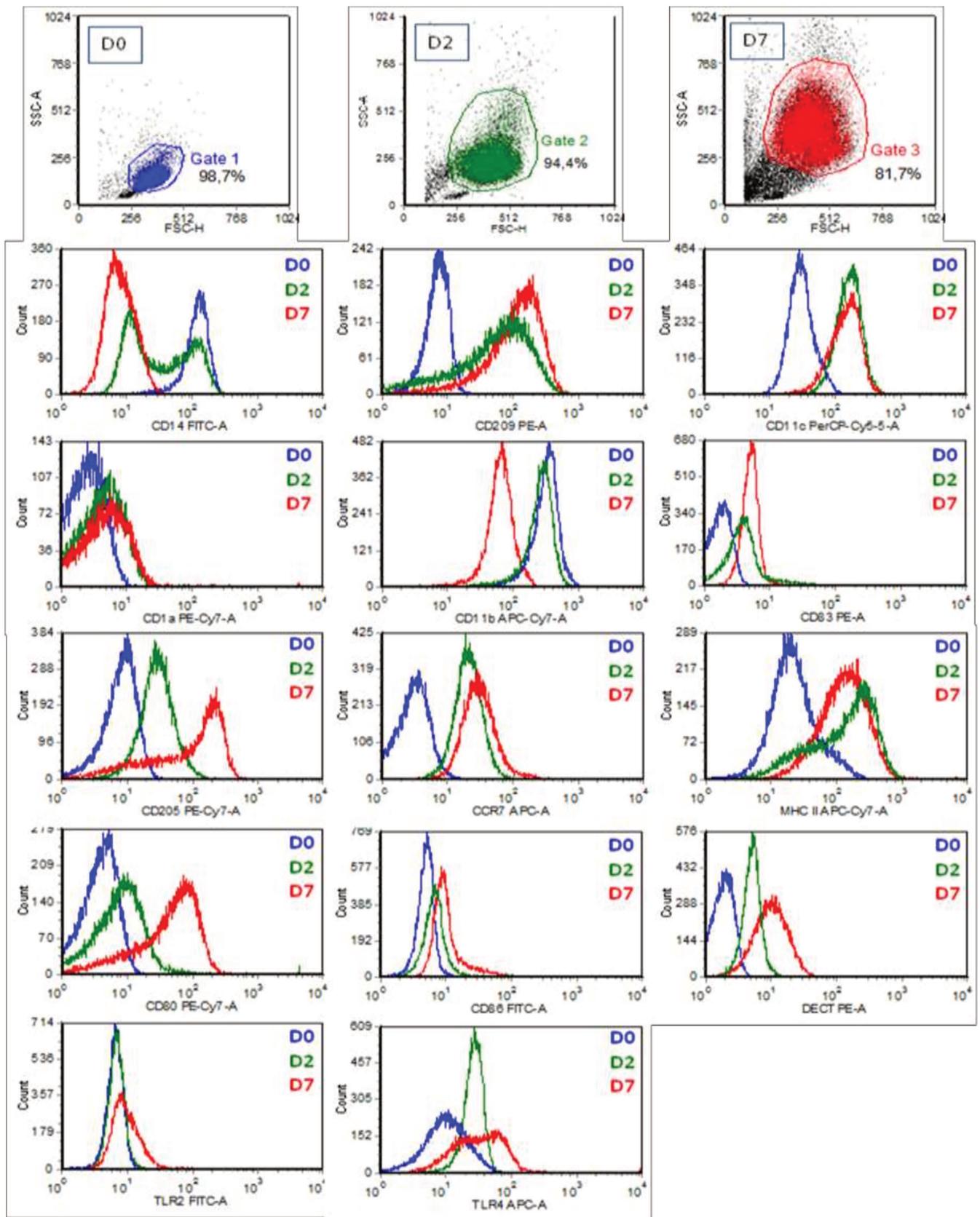
No.	Volume Sangue mL	Células (x10 ⁶) linfomononucleares	Fração (x10 ⁶) Aderente	(x10 ⁶) D7 iDCs	% D7 iDCs
LFF	40	83	59	3,25	5,5
RJPB	60	36,5	13	1,4	10,7
TCSJ	30	85,5	45,5	7,6	17
MGM	40	51,1	36,5	7,5	20,5
MOS	40	96	33,2	7	21
JSS	40	85	43,0	16,0	37,2
CSS	40	107,0	32,0	4,2	13,1
SG	40	30,0	8,0	2,1	26,2
PMDR	40	81,0	52,0	11,7	22,5
WCPS	40	169,0	24,0	1,0	4,1
RLGS	40	60,0	19,0	2,0	10,5
ICP	40	75,5	50,0	3,3	6,6
Média	40,8	79,9	34,6	5,58	16,24

Anexo 6

Diferenciação e caracterização de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico

Os monócitos obtidos conforme descrito no item 4 (material e métodos), foram incubados por 7 dias com citocinas recombinantes (IL-4 – 5ng/ml e GM-CSF – 100ng/mL) adicionadas no 1º dia de cultura, com suplementação adicional, nas mesmas concentrações, nos dias 2 e 5. Após 7 dias de cultura as células foram avaliadas por microscopia e citometria de fluxo para verificar a diferenciação em células dendríticas. Foi utilizado o seguinte conjunto de marcadores para análise da diferenciação celular: anticorpos anti-CD14 (FITC), DEC205 (PE-Cy7), CD209 (PE), CD11b (APC-Cy7), CD11c (PercP-Cy5), CD1a (PE-Cy7), CCR7 (APC), CD80 (PE-Cy7), CD83 (PE), CD86 (FITC), MHC de classe II (APC-Cy7), TLR-2 (FITC), TLR-4 (APC) e dectina-1(PE) (marcação das células foi realizada conforme descrição no item 7 de material e métodos). Na figura abaixo pode ser observado o resultado representativo da cinética de diferenciação das células dendríticas, acompanhadas no dia 0 (monócitos do sangue periférico), e após 2 dias (D2) e 7 dias (D7) de cultura estimuladas com IL-4 e GM-CSF. É possível observar que as células adquirem todos os marcadores característicos de células dendríticas.

Figura 1 (abaixo): “Dot-plots” representativos da análise por citometria de fluxo da distribuição por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da cinética de diferenciação de monócitos do sangue periférico em células dendríticas (D0=monócitos, D2 e D7 = culturas estimuladas com GM-CSF e IL-4 por dois e sete dias respectivamente). Histogramas representativos da marcação de superfície com anticorpos anti-CD14 (FITC), DEC205 (PE-Cy7), CD209 (PE), CD11b (APC-Cy7), CD11c (PercP-Cy5), CD1a (PE-Cy7), CCR7 (APC), CD80 (PE-Cy7), CD83 (PE), CD86 (FITC), MHC de classe II (APC-Cy7), TLR-2 (FITC), TLR-4 (APC) e dectina-1(PE). Os histogramas foram gerados a partir dos gates (gate 1 = D0, gate 2 = D2 e gate 3 = D7) destacados nos “dot-plots”. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células em cada gate.



Anexo 7

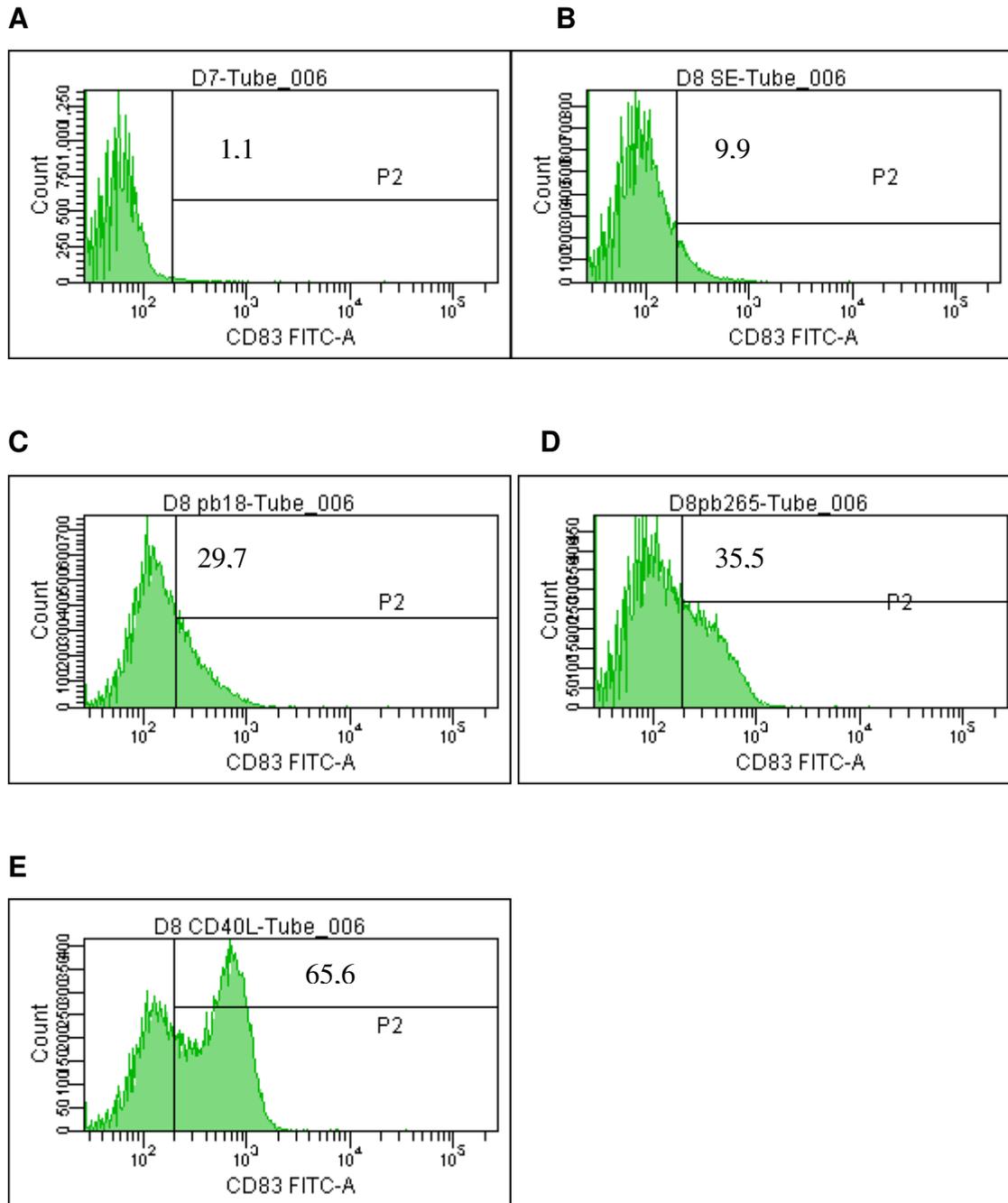
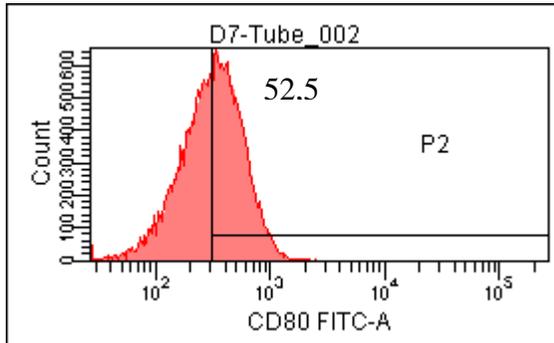


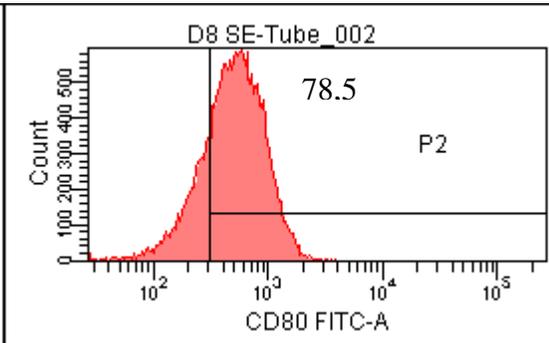
Figura 2: Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da expressão do CD83 em DCs derivadas de monócitos no 7º dia SE (A), 8º dia SE (B), DCs no 8º dia estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* cepa Pb18 (C), Pb265 (D) e CD40L – controle positivo (E).

Anexo 8

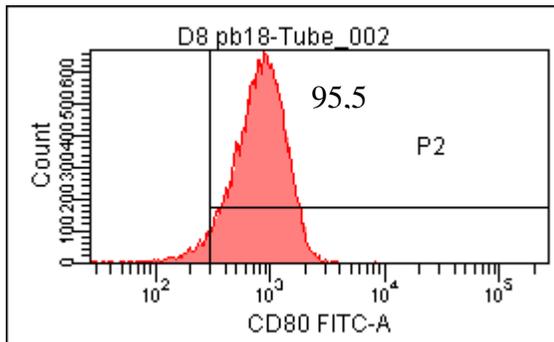
A



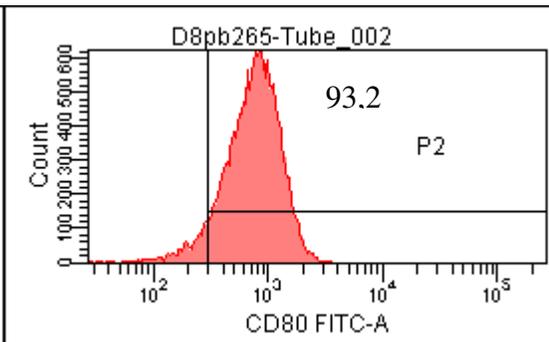
B



C



D



E

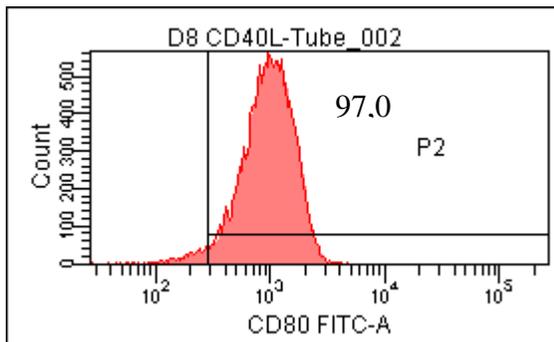
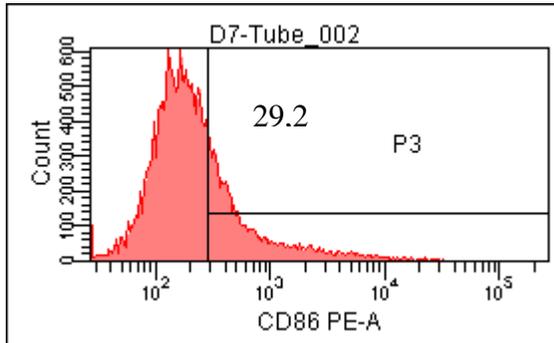


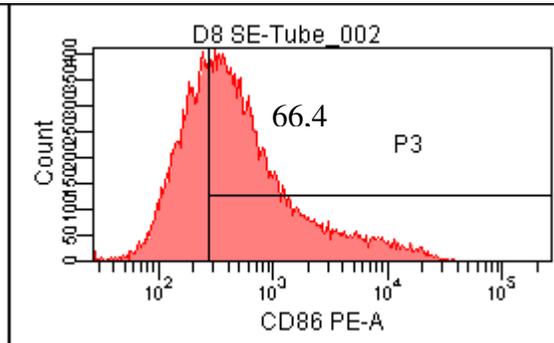
Figura 3: Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da expressão do CD80 em DCs derivadas de monócitos no 7º dia SE **(A)**, 8º dia SE **(B)**, DCs no 8º dia estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* cepa Pb18 **(C)**, Pb265 **(D)** e CD40L – controle positivo **(E)**.

Anexo 9

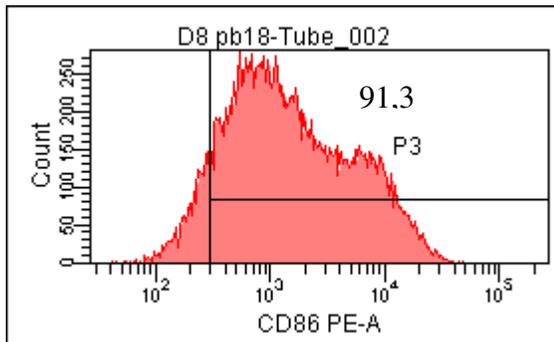
A



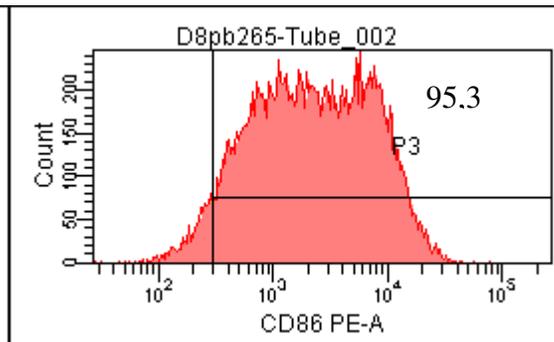
B



C



D



E

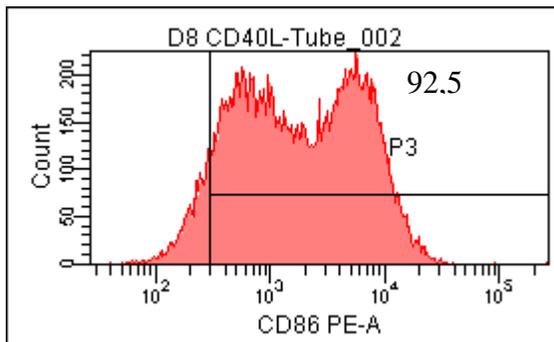


Figura 4: Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da expressão do CD86 em DCs derivadas de monócitos no 7º dia SE **(A)**, 8º dia SE **(B)**, DCs no 8º dia estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* cepa Pb18 **(C)**, Pb265 **(D)** e CD40L – controle positivo **(E)**.

Anexo 10

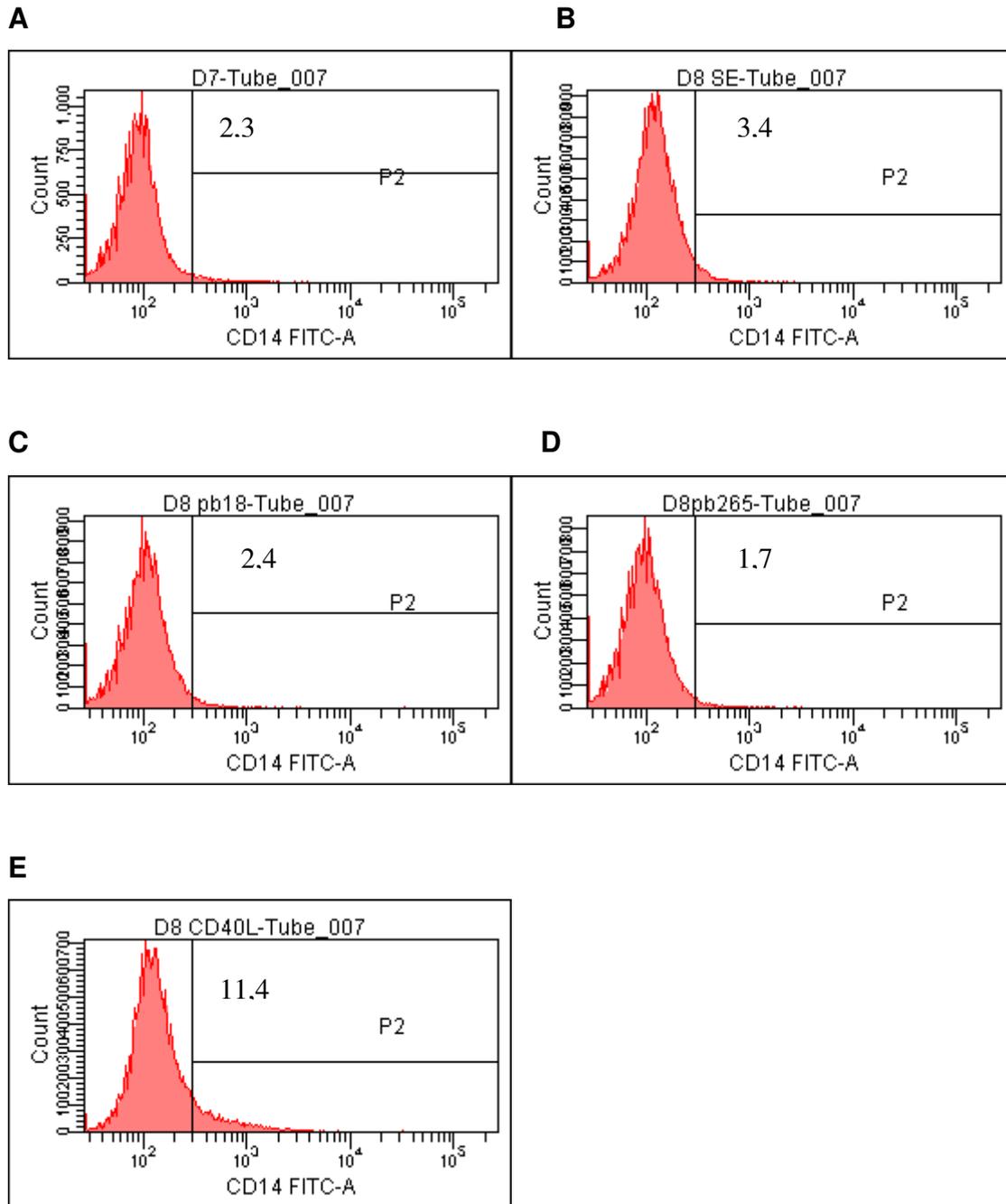
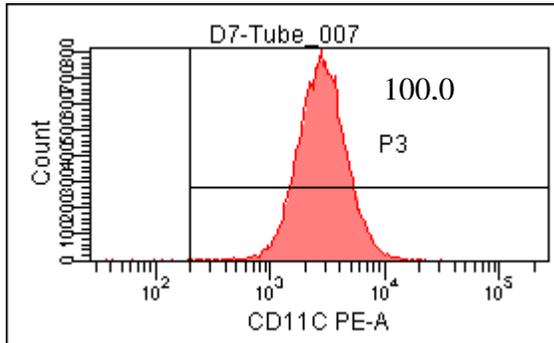


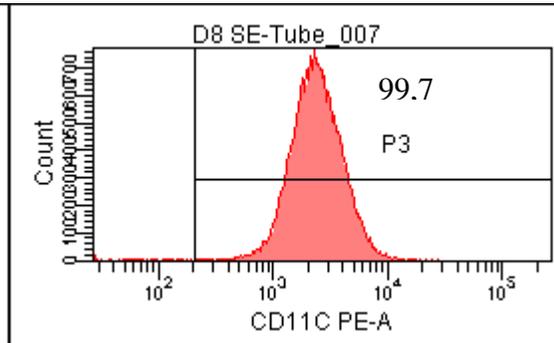
Figura 5: Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da expressão do CD14 em DCs derivadas de monócitos no 7º dia SE **(A)**, 8º dia SE **(B)**, DCs no 8º dia estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* cepa Pb18 **(C)**, Pb265 **(D)** e CD40L – controle positivo **(E)**.

Anexo 11

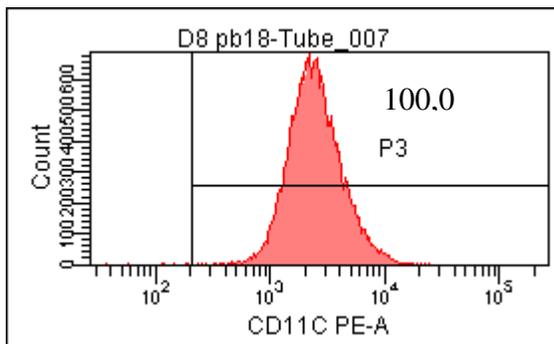
A



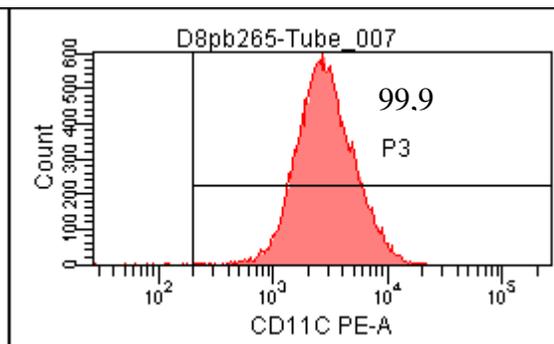
B



C



D



E

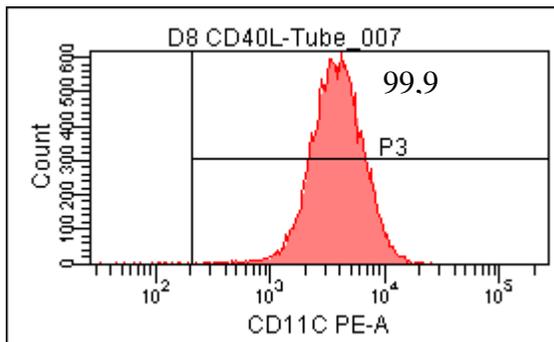


Figura 6: Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da expressão do CD11c em DCs derivadas de monócitos no 7º dia SE **(A)**, 8º dia SE **(B)**, DCs no 8º dia estimuladas por células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* cepa Pb18 **(C)**, Pb265 **(D)** e CD40L – controle positivo **(E)**.