



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS TH17 POR CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS
COM CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS E MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR ENVOLVIDOS**

Maria Carolina Ferreira

Campinas - 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS TH17 POR CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS
COM CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *PARACOCCIDIODES*
BRASILIENSIS E MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR ENVOLVIDOS**

Maria Carolina Ferreira

Este exemplar corresponde a versão final da tese defendida pela aluna Maria Carolina Ferreira e orientada pelo Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni.

Assinatura do Orientador

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação do Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni e Coorientação da Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Campinas - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F413a Ferreira, Maria Carolina, 1983-
Avaliação da capacidade de indução de diferenciação de células TH17 por células dendríticas estimuladas com células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* e mecanismos de sinalização intracelular envolvidos / Maria Carolina Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Ronei Luciano Mamoni.
Coorientador : Maria Heloisa de Souza Lima Blotta.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Células Th17. 3. Células dendríticas. I. Mamoni, Ronei Luciano. II. Blotta, Maria Heloisa de Souza Lima, 1953-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the capability of differentiation of Th17 cells by dendritic cells stimulated with *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells and intracellular signaling mechanisms involved.

Palavras-chave em inglês:

Paracoccidioidomycosis

Th17 cells

Dendritic cells

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Ronei Luciano Mamoni [Orientador]

Jacy Gameiro

Luciane Alarcão Dias Melicio

Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Plínio Trabasso

Data da defesa: 28-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIA CAROLINA FERREIRA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). RONEI LUCIANO MAMONI

MEMBROS:

1. PROF(A).DR(A). RONEI LUCIANO MAMONI

2. PROF(A).DR(A). JACY GAMEIRO

3. PROF(A).DR(A). LUCIANE ALARCÃO DIAS MELÍCIO

4. PROF(A).DR(A). LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS

5. PROF(A).DR(A). PLÍNIO TRABASSO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 28/02/2013

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos # 2008/09176-6 e #2009/05608-1).

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas que tornaram minha jornada mais leve, prazerosa e que deram ânimo e incentivo, aos meus pais Edson e Sandra, ao meu orientador Dr. Ronei e ao meu querido Renato.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e pelas forças que me deu para chegar até aqui.

Agradeço aos meus doadores de sangue, sem os quais esse trabalho não teria sido possível. Aos pacientes com paracoccidioidomicose que sempre gentis, me concederam suas amostras de sangue.

Aos meus pais por me incentivarem sempre a ler, estudar e questionar, por me darem tudo o que eu precisei e nem sempre o que eu quis.

Agradeço ao meu orientador Dr. Ronei Luciano Mamoni pela imensa ajuda, paciência, confiança, pelas broncas (merecidas), pelos conselhos e por sempre estar por perto de seus alunos, sempre nos ajudando e tirando dúvidas.

À Rosiane Silva por sua amizade e pelas belas imuno-histoquímicas.

Aos meus amigos queridos Larissa e Rômulo pelas muitas risadas, capuccinos, conversas e ajuda, tive muita sorte em conhecê-los e vocês vão fazer falta.

Aos meus amigos Márcia, Marcela, Lívia, Munir, Lisandra e Xinaida com os quais tem sido muito bom contar.

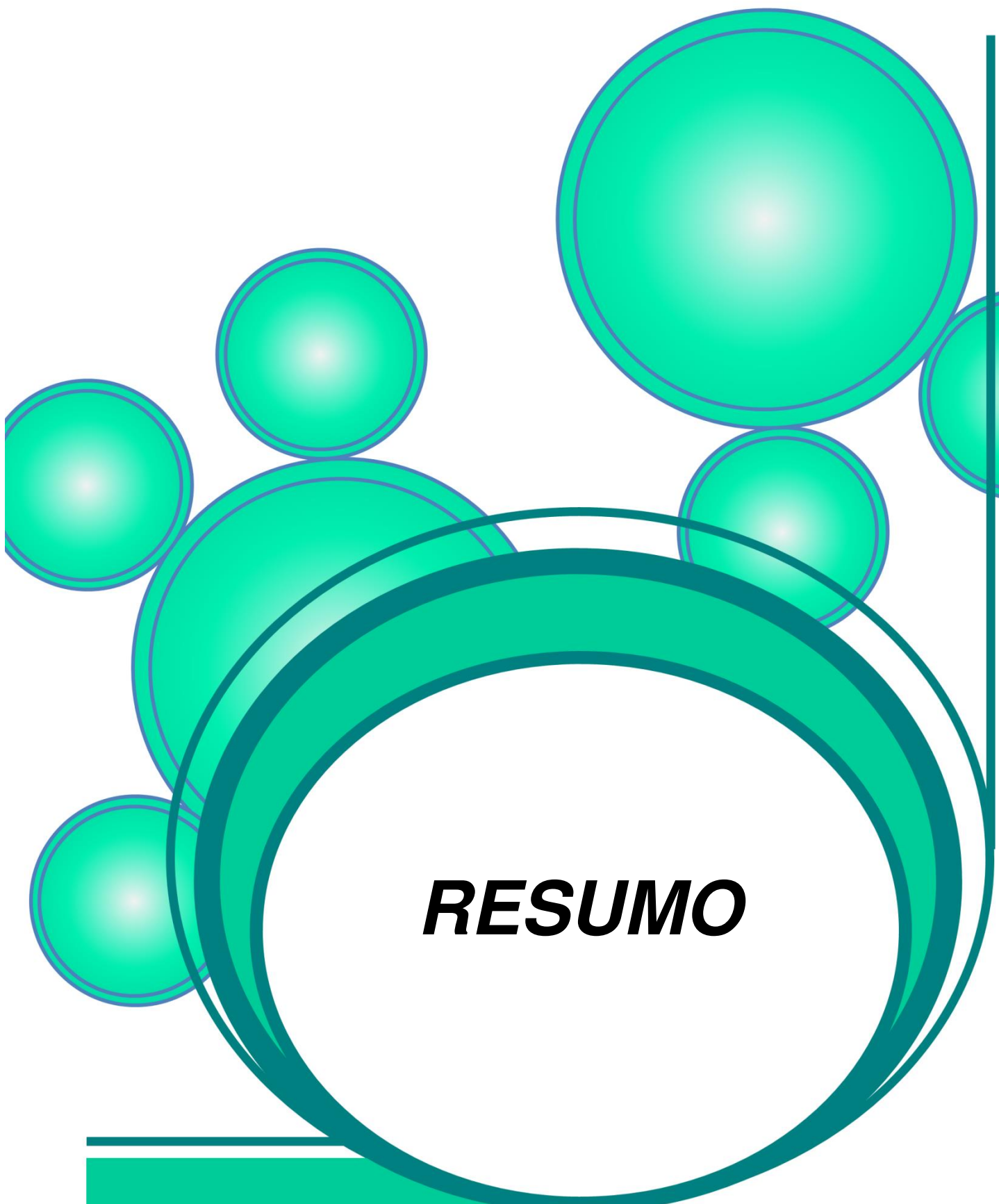
Ao meu marido Renato pelo apoio, carinho e incentivo e ao meu irmão Raphael, por ser meu irmão.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

To Sheila A. Raistrick for your help, friendship, care and prayers.

Agradeço ao Dr. Alexandre Nowill pelo uso do citômetro.

A Luzia e Edson do laboratório de Microbiologia do HC-UNICAMP pela manutenção das culturas de *P. brasiliensis*.

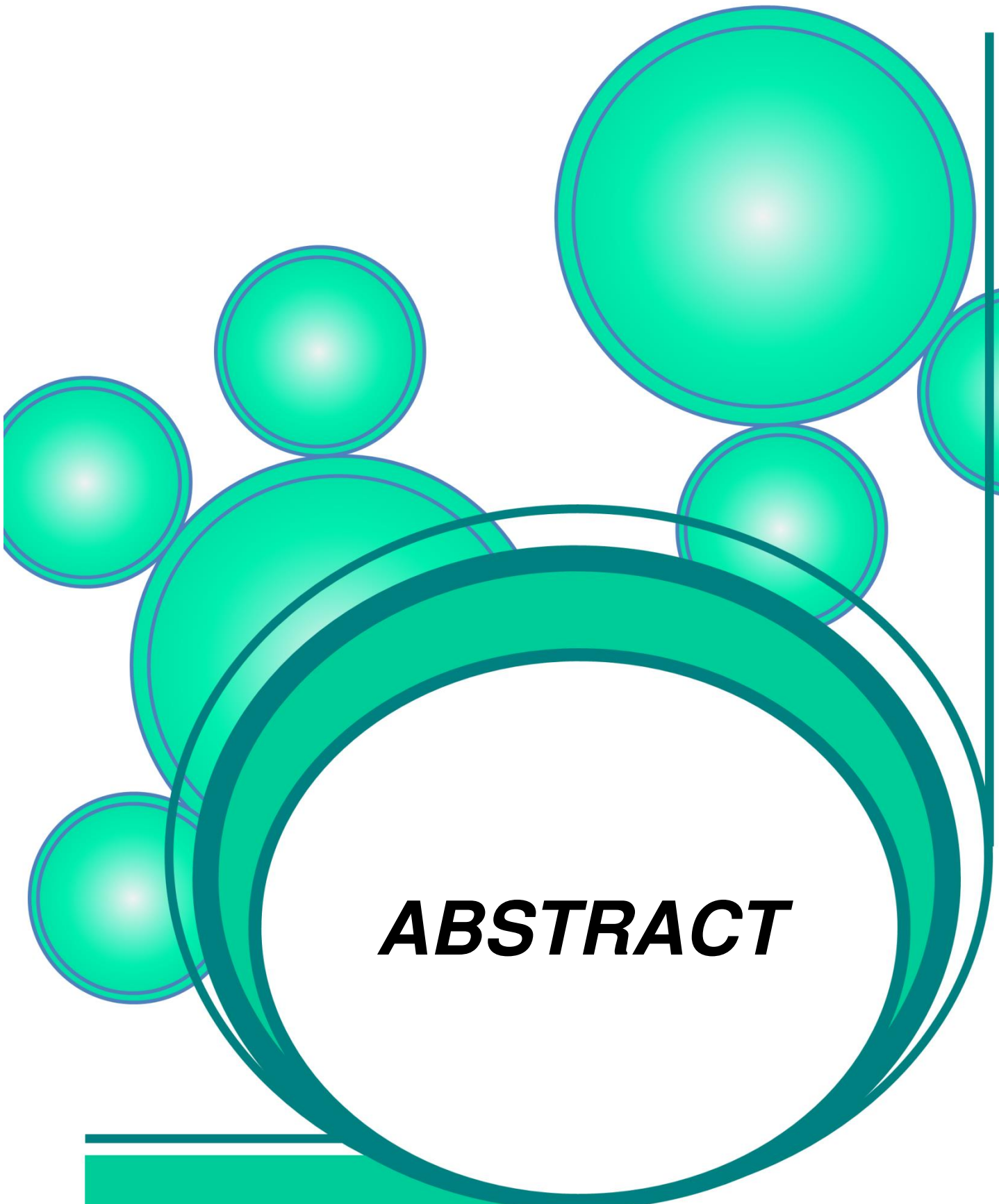
The page features a large, thick, teal-colored ring in the center. Surrounding this ring are several smaller teal circles of varying sizes, some of which have a subtle gradient and a darker teal outline. A vertical teal line runs along the right edge of the page, and a horizontal teal bar is located at the bottom left. The word "RESUMO" is centered within the large ring.

RESUMO

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), é a micose sistêmica de maior incidência no Brasil. Estudos anteriores demonstraram que a resistência ou suscetibilidade à essa infecção podem ser associadas, respectivamente, à padrões de resposta Th1 ou Th2. Recentemente, foram descritas novas subpopulações de linfócitos T, dentre elas as células Th17, que tem se mostrado importantes na proteção contra infecções fúngicas, mas cujo papel ainda não foi estudado na PCM humana. A diferenciação de células T CD4⁺ é modulada após o reconhecimento do patógeno por células dendríticas (DCs) por meio de vários receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os quais modulam a diferenciação de células Th1, Th2 e Th17. Neste trabalho investigamos o papel dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 no reconhecimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb) por DCs derivadas de monócitos, assim como, a capacidade dessas DCs em modular a diferenciação de linfócitos T CD4⁺. Observamos que DCs expostas a células leveduriformes de Pb apresentam um fenótipo maduro (expressão de CCR7, CD83, CD86 e MHC II) e produzem citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α e TFG- β), levando à diferenciação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17, IFN- γ , IL-22, IL-17/IL-22 e IL-17/IFN- γ . Também observamos que DCs estimuladas com células leveduriformes de Pb apresentam ativação de moléculas envolvidas na sinalização via TLRs e Dectina-1 (JNK, p38, Akt e ERK para os TLRs e Syk para Dectina-1), e que o bloqueio de Dectina-1 e/ou TLR2 resultou em um número menor de células Th17. Ao analisar a produção de citocinas por células mononucleares do sangue

periférico, observamos que pacientes com a FJ da PCM apresentam produção aumentada de IL-4 e que pacientes com a FA apresentam produção elevada de IL-17 e IFN- γ . Em conjunto nossos resultados demonstram que a Dectina-1 e TLR2 são os receptores mais importantes para o reconhecimento de leveduras de Pb por células dendríticas e que esse reconhecimento pode levar à diferenciação de linfócitos T efetores produtores de IL-17 e IFN- γ . Além disso, podemos concluir que a FA da PCM apresenta uma resposta imunológica mista, com participação de linfócitos Th17.

An abstract graphic design featuring several teal-colored circles of varying sizes. A large, thick, teal-colored ring is positioned in the lower half of the image, framing the word 'ABSTRACT'. The background is white. There are also some teal lines and a bar at the bottom left.

ABSTRACT

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), is the most prevalent systemic mycosis in Brazil. Previous studies showed that resistance or susceptibility to PCM can be associated to a Th1 or Th2 responses respectively. More recently, Th17 response was showed to be protective in fungal infections, but there is no data about Th17 cells in human PCM. T CD4⁺ differentiation is elicited and shaped after pathogen recognition by dendritic cells (DCs) through several PRRs, which modulate Th1, Th2 and Th17 generation. In this study we evaluated the role of TLR-2, TLR-4 and Dectin-1 in the recognition of Pb yeast cells by monocytes derived DCs, as well as, the capability of these DCs to modulate T CD4⁺ lymphocytes differentiation. We observed that DCs exposed to Pb presented a mature phenotype (expression of CCR7, CD83, CD80, CD86 and MHC II) and produce cytokines (IL-1, IL-6, IL-23, TNF- α and TGF- β) that promote the differentiation of TCD4⁺ lymphocytes producing IL-17, IFN- γ , IL-22, IL-17/IL-22 and IL-17/IFN- γ . We also observed that DCs stimulated by Pb presented activation of molecules involved in the TLRs and dectin-1 signaling (JNK, p38, AKT, ERK - for TLRs and Syk for dectin-1). The blockage of dectin-1 and/or TLR2 diminished the differentiation of Th17 cells. We also analyzed PBMCs from patients with the acute/juvenile form (JF) or the chronic/adult form (AF) of PCM. Our results showed that patients with JF present elevated production of IL-4 and AF patients present higher production of IL-17. Altogether our results showed that Dectin-1 and TLR-2 are the most important receptors for human DCs to recognize Pb yeast cells and to produce cytokines such as IL-6, IL-1 β and TNF- α . After DC

activation and cytokine production these cells are able to induce Th1 and Th17 differentiation through these receptors. Also we showed that Th17 cells are a major population in AF patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Avaliação da ativação de DCs por Pb18 ou agonistas de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1.....	72
Figura 4.2 - Análise de moléculas de ativação em DCs estimuladas com Pb18 ou agonistas de TLR-2, TLR-4 ou Dectina-1.....	73
Figura 4.3 - Avaliação da expressão de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na superfície de DCs estimuladas com Pb18 ou agonistas de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1.....	74
Figura 4.4 - Quantificação relativa da expressão de RNAm para IL-12p35 e IL-23p19.....	75
Figura 4.5 - Quantificação da expressão do RNAm para citocinas em DCs estimuladas com Pb18.....	76
Figura 4.6 Análise da produção de IL-23 e IL-12 por DCs estimuladas com agonistas de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1.....	78
Figura 4.7 - Expressão de citocinas por células dendríticas CD11c ⁺	79
Figura 4.8 - Representação dos gráficos obtidos da análise de linfócitos produtores de IFN- γ e IL-17.....	82
Figura 4.9 - Representação dos gráficos obtidos da análise de linfócitos produtores de IL-17 e IL-22.....	83
Figura 4.10 - Análise das populações de linfócitos produtores de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-22.....	84
Figura 4.11 - Análise da produção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 em sobrenadantes de coculturas de DCs e linfócitos.....	86
Figura 4.12 - Avaliação do número de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ geradas em coculturas de células dendríticas.....	87
Figura 4.13 - Papel do TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na sinalização intracelular via ERK1/2.....	89
Figura 4.14 - Efeitos do bloqueio de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 sobre a sinalização da proteína JNK.....	90
Figura 4.15 - Análise do papel dos receptores TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na fosforilação da proteína AKT em células dendríticas estimuladas com Pb18.....	91
Figura 4.16 - Fosforilação da proteína Syk frente a estimulação com Pb18 e bloqueios de TLR2, TLR4 e Dectina-1.....	92
Figura 4.17 - Análise da fosforilação da proteína p38 em DCs estimuladas com Pb18 e tratadas com bloqueadores para TLR-2, TLR-4 e Dectina-1....	93
Figura 4.18 - Avaliação da produção de IL-12 e IL-23 por DCs previamente tratadas com bloqueadores para TLR2, TLR4 e Dectina-1 e incubadas com leveduras de Pb18.....	94

Figura 4.19 - Avaliação da produção de TGF- β , IL-6, IL-1 β e TNF- α por DCs tratadas com bloqueadores de TLR-2, TLR4 ou Dectina-1 e incubadas com Pb18.....	95
Figura 4.20 - Avaliação das citocinas produzidas por linfócitos estimulados por DCs submetidas a diferentes bloqueios e incubadas com Pb18.....	97
Figura 4.21 - Quantificação da produção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 produzida por linfócitos estimulados por células dendríticas incubadas com Pb18 e bloqueadores de TLR2, TLR4 e Dectina-1.....	99
Figura 4.22 - Quantificação da expressão e citocinas associadas as respostas Th1, Th2, Th9 e Th17 em CMSP de pacientes com PCM (FA e FJ) e controles.....	101
Figura 4.23 - Produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-9 e IL-22 por CMSPs de pacientes com PCM (FA e FJ) e controles.....	103
Figura 4.24 - Representação das populações duplo positivas para IFN- γ e IL-17 em controles, indivíduos com a forma juvenil e com a forma adulta da doença.....	104
Figura 4.25 - Análise de populações duplo ou triplo positivas para IFN- γ , IL-17 e IL-22.....	105
Figura 4.26 - Análise das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-22 e IL-9 produzidas nas culturas de CMSPs de pacientes com a forma juvenil ou adulta da PCM e indivíduos saudáveis.....	107
Figura 4.27 - Análise da produção de IFN- γ em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica.....	108
Figura 4.28 - Análise da produção de IL-4 em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica.....	109
Figura 4.29 - Análise da produção de IL-17 em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica.....	110
Figura 4.30 - Análise da produção de IL-22 em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica.....	111
Figura 8.1 - “Dot-plots” e histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da cinética de diferenciação de monócitos do sangue periférico em células dendríticas.....	165
Figura 8.2 - Modelo proposto para explicar as diferentes respostas imunológicas observadas nas formas clínicas da Paracoccidioidomicose humana.....	167

- **Ahr:** “Aryl hydrocarbon receptor”
- **APCs:** Células apresentadoras de antígenos
- **BSA:** Soroalbumina Bovina
- **cDNA:** Ácido Desoxiribunucleico complementar
- **CFUs:** Unidades Formadoras de Colônias
- **CMNs:** Células Mononucleares
- **CMSP:** Células Mononucleares do Sangue Periférico
- **CRs:** Receptores de complemento
- **DCs:** Células dendríticas
- **DEPC:** Dietilpirocarbonato
- **dNTP:** Deoxiribonucleotídeo
- **DTT:** Ditionitrito
- **ELISA:** Ensaio Imunoenzimático de absorção
- **ERK:** “Extracellular signal-regulated kinase”
- **FA:** Forma Adulta (crônica) da paracoccidioidomicose
- **FJ:** Forma Juvenil (aguda) da paracoccidioidomicose
- **Foxp3:** “Forkhead Box P3”
- **GAPDH:** Dehidrogenase gliceraldeído 3-fosfato
- **GM-CSF:** Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- **H₂O₂:** Peróxido de Hidrogênio
- **HTT:** Testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardio
- **IFN:** Interferon

- **Ig:** Imunoglobulina
- **IL-:** Interleucina
- **IMF:** Intensidade Média de Fluorescência
- **IRFs:** Fatores reguladores de interferons
- **JNK:** “c-Jun N-terminal kinase”
- **LPS:** Lipopolissacarídeo
- **MAPKs:** Proteínas quinases ativadas por mitógenos
- **mDC:** Células dendríticas maduras
- **MHCII:** Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
- **MMP:** Matriz metaloproteinase
- **MRs:** Receptores de manose
- **NO:** Óxido Nítrico
- **NF- κ B:** Fator de transcrição nuclear κ B
- **NK:** Células "Natural Killer"
- **PAMPs:** Padrões moleculares associados a patógenos
- **Pb18:** cepa de alta virulência do fungo *P. brasiliensis*
- **Pb265:** cepa de baixa virulência do fungo *P. brasiliensis*
- **PBS:** Salina Tamponada com Fosfato
- **PBS-BSA-A:** Salina tamponada com fosfato adicionada de Soroalbumina bovina e azida sódica.
- **PCM:** Paracoccidioidomicose
- **pDCs:** Células dendríticas plasmocitóides
- **PHA:** Fitohemaglutinina

- **PI:** Paracoccidiodomicose-infecção
- **PMA:** "Phorbol-Merystate-Acetate"
- **PMN:** Células Polimorfonucleares
- **PMSF:** "phenylmethanesulfonyl fluoride"
- **PRRs:** Receptores de reconhecimento padrão
- **PVDF:** "Polyvinylidene fluoride"
- **qRT-PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real
- **RNA_m:** Ácido Ribonucleico (RNA) mensageiro
- **RIOs:** Reativos Intermediários de Oxigênio
- **Roryt:** Receptor nuclear ROR gama isoforma T
- **SBF:** Soro Bovino Fetal
- **SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio
- **SEM:** Erro Padrão Médio
- **STAT:** "Signal transducer and activator of transcription"
- **Syk:** "Spleen tyrosine kinase"
- **TBS:** Salina tamponada com Tris-hidroximetil-aminometano
- **TBS-T-BSA:** Salina tamponada com Tris-hidroximetil-aminometano adicionada de Tween20 e soroalbumina bovina
- **TGF:** Fator de Transformação de Crescimento
- **Th:** Linfócito T do tipo auxiliar ("helper")
- **TLRs:** Receptores do tipo "*toll*"
- **TNF:** Fator de Necrose Tumoral
- **UFC:** Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	49
2.1. Objetivo geral	49
2.2. Objetivos específicos:	49
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. Casuística	53
3.2. Análise por imunoistoquímica de lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com paracoccidioidomicose.....	54
3.3. Obtenção de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	55
3.4. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico	55
3.5. Separação de monócitos (células CD14 ⁺) e linfócitos (células CD3 ⁺) por seleção imunomagnética positiva	56
3.6. Avaliação do potencial de produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) nos diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.	56
3.7. Diferenciação e caracterização de células dendríticas a partir de monócitos (células CD14 ⁺) do sangue periférico	57
3.8. Condições e estímulos utilizados nas culturas de DCs derivadas de monócitos.	57
3.9. Imunofluorescência para análise de células por citometria de fluxo.	59
3.10. Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR	61
3.10.1. Extração do RNA total e síntese de cDNA.....	61
3.10.2. Protocolo de qRT-PCR	62
3.11. Western-blot/imunoblot	65
3.11.1. Preparação do lisado de células dendríticas	65
3.11.2. SDS-page e western-blotting	65
3.11.3. Imunoblot.....	66
3.12. Análise estatística	68
4. RESULTADOS.....	71
4.1. Análise do efeito da estimulação com células leveduriformes de <i>P.</i>	

<i>brasiliensis</i> e agonistas específicos para TLRs e dectina-1 sobre o fenótipo das DCs derivadas de monócitos.....	71
4.2. Análise do efeito da estimulação de células dendríticas (DCs) com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> sobre a expressão do rnam para citocinas.....	75
4.3. Análise por citometria de fluxo da produção de citocinas por DCs derivadas de monócitos	77
4.4. Análise do perfil de linfócitos diferenciados na presença de DCs submetidas a diferentes estímulos.	80
4.5. Análise da diferenciação de células regulatórias CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ em coculturas de DCs estimuladas com diferentes ligantes de TLR e células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	86
4.6. Efeito do bloqueio da dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteínas ERK, JNK, p38, Syk e Akt.....	88
4.6.1. Efeito do bloqueio da dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína ERK1/2	88
4.6.2. Efeito do bloqueio da dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína JNK.....	89
4.6.3. Efeito do bloqueio da dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína Akt	90
4.6.4. Efeito do bloqueio da dectina-1, dos TLR2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína Syk	91
4.6.5. Efeito do bloqueio da dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína p38	92
4.7. Efeito do bloqueio dos TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na produção de citocinas por DCs estimuladas com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	93
4.8. Efeito do bloqueio dos TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na diferenciação de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e produção de citocinas.....	96
4.9. Análise da expressão do RNAm para os fatores de transcrição e citocinas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ) e controles	99

4.10. Análise da presença de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ produtores de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose.....	102
4.11. Análise por imuno-histoquímica de citocinas produzidas por células da resposta imune adaptativa em lesões de pacientes com PCM.....	107
5. DISCUSSÃO.....	115
6. CONCLUSÕES.....	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
8. APÊNDICE.....	163
8.1. Diferenciação e caracterização de células dendríticas a partir de monócitos (células CD14 ⁺)	163
8.2. Modelo proposto com os diferentes tipos de resposta imunológica observados nas diferentes formas da PCM humana	167

An abstract graphic design featuring several teal-colored circles of varying sizes, some with a gradient and a dark teal outline. A large, thick, dark teal ring is positioned in the lower half of the image, framing the text. A vertical teal line is on the right side, and a horizontal teal bar is at the bottom left.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Dentre as micoses sistêmicas, a paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, encontra-se restrita aos países da América Latina, sendo endêmica em algumas regiões do Brasil [1, 2]. A infecção provavelmente ocorre por meio da inalação de propágulos do fungo que se depositam nos pulmões causando lesões locais, ou que podem se disseminar via corrente sanguínea ou linfática para diversos órgãos como fígado, baço, glândulas suprarrenais, medula óssea, mucosas e pele [1, 3].

A infecção pelo *P. brasiliensis* pode ter três resultados: 1) a PCM-infecção (PI), comum em indivíduos que residem ou trabalham em áreas endêmicas e que entram em contato com o fungo, mas que não desenvolvem sinais clínicos da doença; 2) a forma aguda ou juvenil (FJ) mais comum em crianças e jovens de ambos os sexos, e caracterizada pelo acometimento dos linfonodos, fígado, baço e disfunção na medula óssea; e 3) e a forma crônica ou adulta (FA) com maior prevalência entre homens adultos com idade variando de 30 a 60 anos. A forma adulta apresenta manifestações clínicas que variam desde lesões pulmonares isoladas (forma unifocal) ao acometimento sistêmico (forma multifocal), com lesões na pele e mucosas [1, 3, 4]. Em relação às duas formas da doença, em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de intervenção por meio de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças [3, 5, 6].

O desenvolvimento de modelos experimentais da infecção pelo *P. brasiliensis* permitiu compreender de forma mais clara a relação entre a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro e as diferentes manifestações da

paracoccidioidomicose [7]. Camundongos suscetíveis (linhagem B10.A) apresentam resposta imune celular deprimida, evidenciada pela proliferação de linfócitos e reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) diminuídas frente a estímulos com antígenos do fungo [5]. Além disso, produzem preferencialmente citocinas do tipo T "helper" do tipo 2 (Th2) como Interleucina(IL)-4, IL-5 e IL-10, e anticorpos das classes IgG1 e IgA [8-11]. Após a infecção, esses camundongos apresentam disseminação do fungo por todo organismo, evidenciando a sua incapacidade para o controle da doença. Por outro lado, nos camundongos resistentes (linhagem A/Sn – A/J) a resposta imunológica celular é preservada, com linfoproliferação e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1 como o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) assim como produção de anticorpos da classe IgG2a [8-10].

Esses achados no modelo experimental encontram paralelo na doença humana. Indivíduos apresentando a FJ da PCM apresentam uma resposta predominantemente Th2, com produção aumentada (*in vitro*) de citocinas supressoras da resposta imune celular como a IL-4, IL-5, IL-10, o fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β) e baixa produção de IFN- γ e TNF- α [12-16]. Esses indivíduos também produzem quantidades elevadas de anticorpos específicos com predominância dos isotipos IgG4, IgE e IgA, cuja mudança de classe é regulado por citocinas Th2 como a IL-4 e pelo TGF- β assim como número elevado de eosinófilos na circulação e infiltrando as lesões [13, 17-21]. Já os indivíduos com a FA desenvolvem uma resposta mista, o que resulta em diferentes apresentações clínicas da doença, produzindo citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α e quantidades variáveis de IL-10 e IL-4 [14-16]. Quanto à

resposta imune humoral, produzem menores níveis de anticorpos quando comparados a indivíduos com a forma juvenil, com predomínio das classes IgG1 e IgG2 [13, 17, 18]. Já os indivíduos apresentando a PCM-infecção não apresentam sinais clínicos de doença e tampouco produzem anticorpos específicos, mas desenvolvem resposta celular vigorosa contra antígenos do fungo e produzem quantidades elevadas de IFN- γ , IL-2 e TNF- α e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 [14-16].

Os dados expostos acima indicam que a resposta imunológica efetiva, com participação de células Th1, é de extrema importância para a resistência e o controle da infecção causada pelo *P. brasiliensis*, destacando-se o papel do IFN- γ nessa proteção. Entretanto, apesar do balanço entre as respostas Th1 e Th2 explicarem muitas das diferenças entre as formas clínicas da doença e a PCM-infecção, algumas características ainda não puderam ser explicadas. Resultados intrigantes, tanto na doença humana quanto experimental, têm mostrado que a resposta inflamatória exacerbada, principalmente na fase inicial da infecção, está relacionada às formas mais graves da paracoccidioidomicose e pior controle da doença por parte do hospedeiro [22-24]. Camundongos suscetíveis (linhagem B.10) à infecção pelo *P. brasiliensis*, quando infectados por via intratraqueal, apresentam uma resposta imunológica inicial caracterizada pela grande produção de mediadores inflamatórios (em teoria relacionada a uma resposta Th1) e pelo infiltrado de grande número de neutrófilos. Por outro lado, camundongos resistentes, produzem quantidades moderadas desses mediadores e menor infiltrado inflamatório [25]. Outro fato observado na paracoccidioidomicose é de

que células de pacientes com a FA da doença quando estimuladas *in vitro* produzem quantidades elevadas de IL-12p40/p70, detectadas tanto no sobrenadante de culturas [14], como por citometria de fluxo [15], não sendo observado, contudo, aumento na produção de IFN- γ [14].

Recentemente, linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 foram identificados como sendo uma subpopulação com origem distinta dos linfócitos Th1 e Th2, sendo denominados de Th17 [26, 27]. Essas células foram identificadas por apresentar um papel de grande importância em doenças autoimunes como a esclerose múltipla (e seu modelo experimental – encefalomielite autoimune experimental), a artrite reumatóide e as doenças inflamatórias intestinais [28, 29].

Apesar de terem sido inicialmente descritas na resposta imunológica em doenças autoimunes, atualmente a participação de células Th17 também tem sido descrita tanto na resistência como na suscetibilidade a doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários e fungos [30-36]. Na tuberculose pulmonar humana, foi demonstrada diminuição da quantidade de células Th17 na circulação periférica em comparação ao observado em indivíduos saudáveis, situação revertida após o tratamento efetivo [37-39]. A presença de células Th17 e a produção local de IL-17 nos pulmões aparentemente estimula as células epiteliais, macrófagos e células endoteliais a produzirem citocinas e quimiocinas inflamatórias como a CXCL8, IL-1 β , IL-23, IL-6 e de peptídeos com ação antibacteriana como as defensinas, induzindo o acúmulo de neutrófilos e de outras células inflamatórias, que desempenham papel importante no controle da doença [32]. No modelo experimental da tuberculose, a produção de IL-17 também leva a

resposta favorável, participando de forma importante para a formação do granuloma, e estimulando a produção de quimiocinas inflamatórias como a CXCL9 e CXCL10, o que levaria ao recrutamento secundário de células Th1 e ao aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ [40-43]. Na infecção causada pelo *Trypanossoma cruzi* a IL-17 foi relacionada à indução da resposta imunológica, principalmente através da estimulação para a produção de IFN- γ e outras citocinas [36].

Após a sua descrição, a participação das células Th17 na resposta imunológica a doenças causadas por fungos começou a ser bastante estudada, e a IL-17 foi apontada como uma das principais citocinas que promovem a resistência a esses agentes patogênicos [34, 44-46].

Em doenças inflamatórias do trato respiratório, a produção de IL-17 é apontada como uma das principais citocinas efetoras no recrutamento de neutrófilos [47-49]. Neutrófilos são células de origem mielóide, que constituem a maioria dos leucócitos presentes na circulação. Essas células, juntamente com os macrófagos, são as primeiras a serem recrutadas para o sítio de infecção durante a resposta inflamatória, e têm como função principal a ingestão dos microorganismos (fagocitose) e posterior destruição dos mesmos. Para a destruição dos patógenos os neutrófilos, após sua ativação, produzem grandes quantidades de Reativos Intermediários de Oxigênio (RIOs), assim como de óxido nítrico (NO). Além dos RIOs, os neutrófilos também produzem e liberam no sítio inflamatório uma série de enzimas proteolíticas como elastases, catepsina-G e matriz-metaloproteinases (MMPs). Essas enzimas podem levar à destruição dos

tecidos do hospedeiro, sendo responsáveis por muitas das imunopatologias observadas em processos inflamatórios crônicos [50, 51].

Como mencionado, a infecção pulmonar experimental pelo *P. brasiliensis* leva ao recrutamento de neutrófilos ao pulmão [25, 52]. A análise do lavado bronco alveolar de pacientes com a forma pulmonar da paracoccidiodomicose mostra aumento do influxo de neutrófilos para esse compartimento [53, 54]. A presença dessas células também é característica de lesões causadas pelo *P. brasiliensis* em outros órgãos e tecidos [1, 55].

A diferenciação de células T nas diversas subpopulações é regulada principalmente pela presença de certas citocinas produzidas no ambiente onde ocorre a apresentação do antígeno. A interação dessas citocinas com seus receptores leva a sinalização intracelular específica, e posterior ativação de fatores de transcrição que são característicos de cada uma dessas subpopulações [56, 57]. Assim, células Th1 se diferenciam quando citocinas como a IL-12 e IFN- γ estão presentes no meio, as quais levam à ativação de fatores de transcrição como a STAT-1, STAT-4 e T-bet. As células Th2 se diferenciam na presença de IL-4, que sinaliza via STAT-6 e GATA-3 [56-58]. De maneira geral as células Th17 se diferenciam na presença de TGF- β e IL-6, sendo que outras citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α podem ter efeitos adicionais [57, 59-63]. Além dessas citocinas, também é importante a presença de IL-23 que promove a sobrevivência e a diferenciação adicional dessas células. A diferenciação de células Th17 ocorre por meio da sinalização via STAT-3 e ROR γ t [61-64].

Além das células Th1, Th2 e Th17, recentemente foram descritas novas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ caracterizadas pela produção de citocinas específicas. Assim, foram descritas células produtoras de grandes quantidades de IL-9 e IL-21. Essas células aparentemente necessitam de IL-4 e TGF- β para sua diferenciação, mas ainda não está claro se elas se diferenciam diretamente de células *naïve*, sendo portanto uma linhagem distinta (provisoriamente denominadas de Th9) ou se são diferenciadas a partir de células Th2 [65, 66]. As células Th9 apresentam grande importância na produção de anticorpos, participando ativamente nessa função em conjunto com as células Th2 [66]. Também foram descritas células capazes de produzir grandes quantidades de IL-22 sem, contudo, produzirem IL-17. Essas células produtoras de IL-22 (denominadas de Th22) aparentemente desempenham papel importante na resposta inflamatória observada no epitélio em algumas doenças como a psoríase. A IL-22, é fundamental na defesa contra agentes bacterianos intestinais [67, 68], contra bactérias pulmonares gram-negativas, tais como *Klebsiella pneumoniae* [69, 70] e contra o fungo *Candida albicans* [71], sendo importante para a regulação da resposta tecidual durante a inflamação. As células Th22 podem ser importantes na resposta imunológica a fungos, visto sua participação na resposta imunológica que ocorre nas mucosas e na superfície dos epitélios [72].

Assim como as outras populações de linfócitos, além das citocinas produzidas, essas novas populações celulares são caracterizadas pela expressão de fatores de transcrição específicos como o PU.1 (para as células produtoras de IL-9) e AHR (nas células produtoras de IL-22) [73, 74]. Sendo esses fatores de

transcrição importantes para a produção das citocinas que caracterizam essas células.

Para a diferenciação das diferentes subpopulações de linfócitos T é fundamental a participação de células da resposta imunológica inata, particularmente das células dendríticas (DCs). 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 [75]. A resposta imune inata é capaz de reconhecer diversas classes de patógenos e desta forma detecta a presença e a natureza da infecção, iniciando e determinando a resposta efetora da imunidade adaptativa. 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), citocinas e quimiocinas inflamatórias, que interagem diretamente com microrganismos levando à sua destruição ou inibição de seu crescimento [75]. Estes mecanismos têm um efeito profundo no desenvolvimento da resposta adaptativa, que é ativada em uma fase mais tardia da resposta imunológica [23].

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 [34, 76].

Os TLRs constituem um dos grupos mais importantes de proteínas transmembrana capazes de interagir com patógenos. Pelo menos 11 membros desta família foram descritos em humanos [77]. A ativação dos TLRs resulta na produção de vários mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios que regulam a resposta imune adaptativa [76].

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 [23, 76]. Estudos posteriores também atribuíram ao TLR2 a indução de uma resposta imune anti-inflamatória no hospedeiro [78]. 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) [79]. 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 linfócitos T CD4⁺CD25⁺ [80, 81].

Leveduras do *P. brasiliensis* são capazes de ativar TLR2 e TLR-4 de macrófagos, causando o aumento da sua atividade fagocítica e produção de óxido nítrico [82]. Diferentemente, foi observado 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 diminuição do número de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e controle mais efetivo da doença [83]. 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 células T regulatórias, comparado a animais C3H/HePas que expressam receptores funcionais [84].

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 leveduras da linhagem Pb265 (baixa virulência) induzem balanço na produção TNF- α /IL-10, o que poderia possibilitar melhor controle da infecção pelo hospedeiro, evitando uma resposta inflamatória exacerbada [85]. Por outro lado, Acorsi-Valerio *et. al.*, (2010) mostraram que a ativação de neutrófilos humanos por leveduras da linhagem 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 [86].

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, um 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* [87, 88].. 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 [87, 88]. Alguns trabalhos sugerem que a Dectina-1 age em sinergismo com TLRs, promovendo uma resposta inflamatória exacerbada [89]. Camundongos deficientes em Dectina-1 são mais suscetíveis à infecção por *Candida albicans* e *Pneumocystis jirovecii* [87].

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 células T [90]. Os receptores do tipo *toll* induzem uma resposta Th1; enquanto que a Dectina-1 pode levar a produção de IL-23 e IL-6 determinando a polarização para a resposta do tipo Th17 [76]. De modo interessante, foram demonstradas diferenças na resposta às formas de levedura e de hifas de *C. albicans*, indicando que ocorre a produção diferencial de IL-23 por células dendríticas, induzida por essas duas formas do patógeno. Enquanto as hifas induzem a produção de IL-23, o mesmo não ocorre com a forma de levedura, que por sua vez induz a produção de IL-12 [59]. Essa resposta diferencial frente às duas formas de *C. albicans*, provavelmente se deve ao reconhecimento desses patógenos por receptores específicos em células apresentadoras de antígeno (“Toll-like receptors” – TLRs ou Dectina-1) [31]. LeibundGut-Landmann *et al.*

(2007) [91] demonstraram que células dendríticas estimuladas com ligante específico de Dectina-1 (Curdlan) são capazes de promover a diferenciação de células T “naive” em células Th17. Por outro lado, Acosta-Rodriguez *et al.* (2007) [92] demonstraram que células dendríticas estimuladas com LPS (ligante de TLR4) são pouco eficientes para a diferenciação de linfócitos Th17, mas que monócitos estimulados com essa molécula podem induzir essa diferenciação. Os monócitos, estimulados com ligantes de TLR2 e dectina-1 (zymozan) e TLR4 (LPS) também parecem contribuir para a expansão de células T de memória (CD45RO⁺) produtoras de grandes quantidades de IL-17 [93]. Os TLRs de maneira geral (com exceção do TLR3) sinalizam via uma molécula adaptadora em comum (MyD88 – sendo que o TLR2 utiliza a molécula adaptadora MAL), enquanto que a Dectina-1 sinaliza via Syk e Card-9, e essa ativação diferencial aparentemente leva a produção diferencial de citocinas [31]. Como mencionado, estudos realizados em nosso laboratório indicam que leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de estimular monócitos e neutrófilos por meio desses receptores (TLRs e Dectina-1) induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, e que diferentes cepas de *P. brasiliensis* (Pb18 – virulenta e Pb265 – avirulenta), são reconhecidas por um conjunto de receptores distintos [85].

Vários tipos de células podem exercer a função de apresentação de antígenos (APCs) como macrófagos, monócitos, linfócitos B, DCs e células endoteliais [94]. Entretanto apenas as DCs são consideradas APCs profissionais, pois são fundamentais para manter a tolerância aos antígenos próprios para ativar as células T *naive*, efetoras e memória e para interagir com células do sistema

imune inato, potencializando assim a resposta imune adaptativa [95-97]. 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 propriedades funcionais distintas [98]. Desta forma, as DCs mantêm a homeostasia entre as subclasses de linfócitos T *naïve* CD4⁺ e CD8⁺ [99].

De maneira geral, as DCs podem ser classificadas como DCs mielóides ou plasmocitóide (pDCs). As pDCs estão envolvidas na imunidade anti-viral, expressam TLR7 e TLR9 e produzem grandes quantidades de IFN do tipo I [79, 100, 101]. Em humanos, DCs mielóides podem ser produzidas *in vitro* a partir de monócitos CD14⁺ do sangue periférico que representam 10% dos leucócitos circulantes [102]. Os monócitos são células imunes efectoras que expressam 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 [96, 102].

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 [103]. A combinação destas citocinas para a obtenção de DCs com fenótipo imaturo a partir da diferenciação de

monócitos foi descrita por vários autores [104-106]. Estas células mielóides diferenciadas na presença de GM-CSF produzem grandes concentrações de TNF- α e óxido nítrico após estimulação com microrganismos patogênicos [107].

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 moléculas de MHCII, CD80 e CD86, quando comparado com macrófagos e linfócitos B e são capazes de estimular a produção de citocinas do tipo Th1 (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) [108]. 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 [109].

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 leveduras de *P. brasiliensis* ou com gp43 (com ou sem LPS) expressam baixas concentrações de antígenos MHC-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 leveduras 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 [110]. Além disso, foi verificado que a baixa expressão das moléculas coestimulatórias e a baixa

produção de IL-12 por DCs estimuladas pela gp43 induzem resposta Th1 deficiente, com aumento do número das unidades formadoras de colônias (CFUs) do fungo nos pulmões [111].

Do mesmo modo, 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 [112]. Estes estudos demonstram o importante papel das DCs no controle da resposta imune na PCM experimental e sua influência na suscetibilidade ou resistência à doença. Entretanto, existem poucos trabalhos que avaliaram a participação das DCs na infecção humana pelo *P. brasiliensis*.

Como mencionado a resposta imunológica efetiva aos agentes infecciosos depende do balanço entre os tipos de resposta imunológica adquirida desenvolvidos pelo hospedeiro. Trabalhos recentes apontam para uma grande heterogeneidade e plasticidade dessa resposta, com a participação de diferentes populações de células efetoras (Th1, Th2, Th17, Th9 e Th22) e de células regulatórias. Estudos anteriores, incluindo alguns de nosso grupo, demonstraram que as diferentes formas da PCM podem ser relacionadas a diferentes tipos de resposta imunológica, bem como à participação de células T regulatórias. Apesar desses estudos demonstrarem a importância da resposta Th1 e Th2 na PCM, algumas características da doença não podem ser explicadas somente por esse modelo. Essas características podem ser indícios da participação de outras subpopulações de linfócitos T, que poderiam levar à resistência ou

susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*. Além disso, ainda não está bem determinado de que maneira o reconhecimento das leveduras de *P. brasiliensis* é feito por células dendríticas, e de que maneira esse reconhecimento pode levar à diferenciação das diferentes subpopulações de linfócitos T.

An abstract graphic design featuring several teal-colored circles of varying sizes. A large, thick, teal-colored ring is positioned in the lower half of the image, framing the word 'OBJETIVOS'. The background is white, and there are teal horizontal and vertical lines at the bottom and right edges respectively.

OBJETIVOS

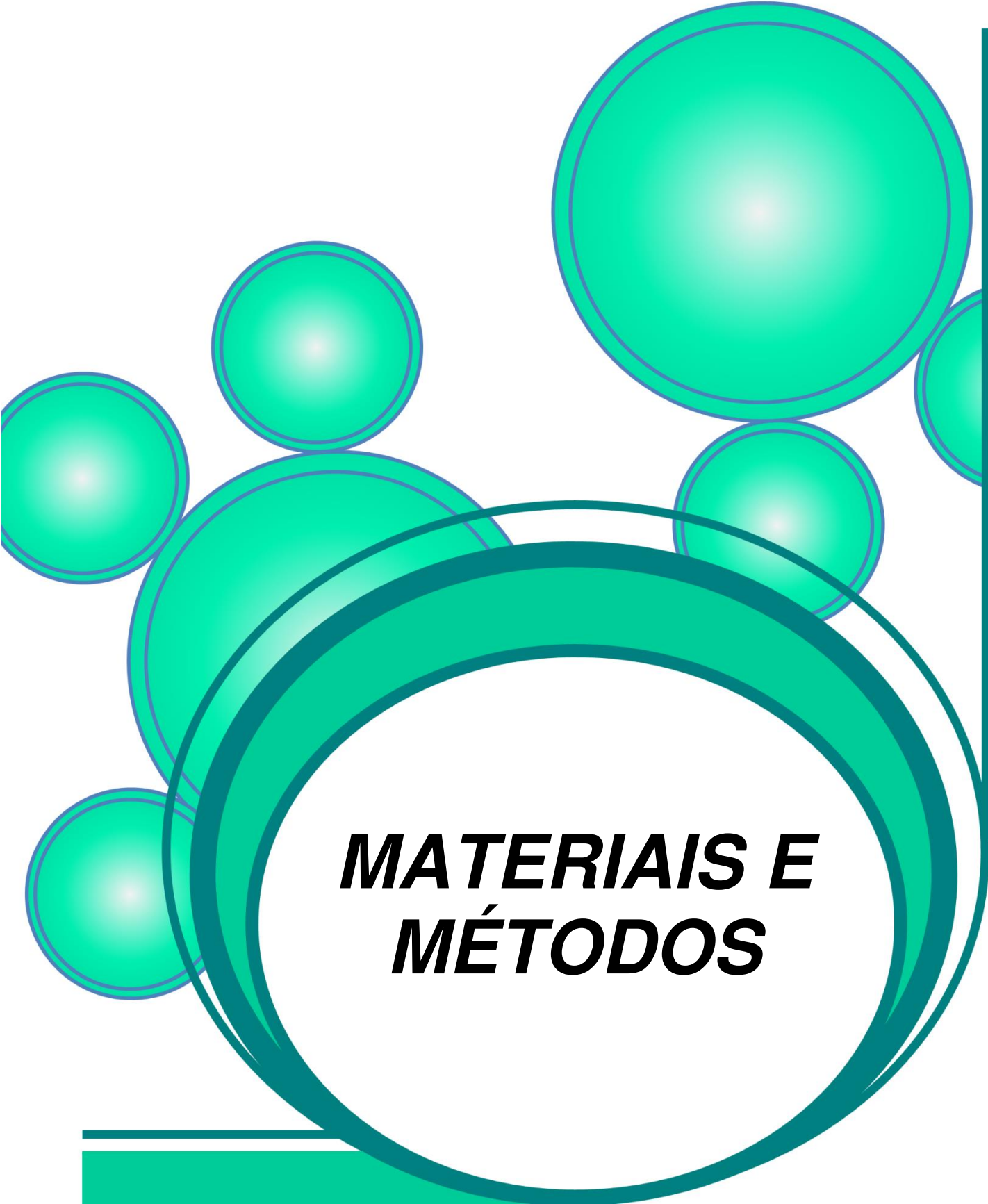
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar os receptores envolvidos no reconhecimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* por células dendríticas derivadas de monócitos; e de que maneira essas células influenciam na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ efetores.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos do estímulo de células leveduriformes de *P. brasiliensis* sobre a maturação e ativação de células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos.
- Avaliar se o reconhecimento e a ativação de células dendríticas por leveduras de *P. brasiliensis* ocorre por meio de TLRs (TLR2 e TLR4) e/ou pela Dectina-1, por meio da análise de moléculas envolvidas na sinalização intracelular, e por meio do bloqueio desses receptores.
- Avaliar a capacidade de DCs em estimular a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em populações efectoras (Th1, Th2 e Th17).
- Determinar o fenótipo dos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com as formas aguda/juvenil e crônica/adulta da paracoccidiodomicose quanto à produção de citocinas.

An abstract graphic design featuring several teal-colored circles of varying sizes. A large, thick teal ring is positioned in the lower half of the image, framing the text. A vertical teal line runs along the right edge, and a horizontal teal bar is at the bottom left.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Para a realização dos diversos experimentos descritos foi utilizado um número variável de amostras de sangue, obtidas de controles normais e pacientes com a forma crônica/adulta multifocal (FA) ou com a forma aguda/juvenil (FJ) da paracoccidiodomicose.

Os indivíduos do grupo controle foram recrutados na zona endêmica de Campinas, anteriormente identificados por apresentarem teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio negativo à gp43 (antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*) e não apresentavam no momento da coleta nenhum sintoma de qualquer doença em atividade. Pacientes com paracoccidiodomicose foram selecionados no ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP, foram incluídos somente pacientes apresentando doença ativa antes do início (pós-diagnóstico) ou no máximo com um mês de tratamento, que apresentavam sintomas e exames laboratoriais compatíveis com paracoccidiodomicose em atividade. Os pacientes foram classificados quanto à forma clínica conforme os critérios estabelecidos por Franco *et al.* (1987)[4]. Cada indivíduo foi informado sobre sua participação na pesquisa, assinando um termo de consentimento pós-informação, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Para a análise por imunoistoquímica foram utilizados tecidos de biópsias obtidas para fim diagnóstico (mucosa oral ou linfonodos), fixadas e embebidas em parafina, arquivadas no setor de Anatomia Patológica do HC da UNICAMP.

3.2. Análise por imunoistoquímica de lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com paracoccidioidomicose

Foram analisados 10 amostras diferentes de pacientes com a FA (mucosa oral – FA multifocal) e 10 amostras diferentes de pacientes apresentando a FJ da PCM (linfonodos). As lesões incluídas no estudo foram aquelas que apresentavam leveduras de *P. brasiliensis*.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes sequenciais com espessura de 3-5 µm em micrótomo, e as lâminas foram submetidas à desparafinização por banhos sequenciais em xilol e etanol. Após a desparafinização, os tecidos foram submetidos à recuperação antigênica.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram submersas em tampão de recuperação (EDTA pH 9,3) em recipientes adequados e submetidos a aquecimento em panela de vapor a 95°C por 30 minutos. Após o aquecimento as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente. Após a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos à marcação com anticorpos específicos (anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL17, anti-IL22 e anti-IL-9). Os anticorpos foram titulados para otimizar a marcação e evitar ligações inespecíficas (dados não mostrados). As etapas de bloqueio de peroxidase endógena, de adição do anticorpo secundário e revelação foram feitas com reagentes fornecidos com o “kit” do sistema NovoLink (Max Polymer Detection System – Novocastra Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante. Após a realização da marcação, os tecidos foram contracolorados com hematoxilina e as lâminas montadas em entelan.

3.3. Obtenção de células leveduriformes de *P. brasiliensis*

Culturas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* da cepa de alta virulência Pb18 foram mantidas a 36°C em meio Fava-Netto por 5 dias. Após esse período as colônias formadas foram coletadas e lavadas em PBS estéril e, para a obtenção de células individuais, a suspensão de células leveduriformes foi submetida à agitação em vórtex em tubos contendo esferas de vidro de 4mm durante 30 segundos por três vezes. Após a dissolução dos grumos, os tubos foram deixados em repouso a 37°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O número de células leveduriformes viáveis foi determinado por contagem em hematocítômetro na presença do corante verde de Janus. Foram utilizadas suspensões contendo mais que 85% de fungos viáveis. O número de células leveduriformes utilizado em cada experimento foi acertado conforme a necessidade.

3.4. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico

O sangue periférico dos doadores saudáveis e de pacientes com a forma aguda/juvenil (FJ) ou forma crônica/adulta (FA) da paracoccidioidomicose foi coletado (80-100mL) em tubos contendo heparina sódica. Para a separação da fração de células mononucleares (CMNs) as amostras foram centrifugadas sobre uma solução de ficoll-hypaque (densidade 1,077 - 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente), sendo as células mononucleares (CMNs – anel sobre a solução de ficoll-hypaque) transferidas para outros tubos tipo falcon de 15 mL. As CMNs foram então submetidas a duas lavagens com meio RPMI (300 g por 10 minutos a 4°C). Após a lavagem, as CMNs tiveram seu número e viabilidade

estimado (câmara de Neubauer e azul de Tripan) e utilizadas para realização dos experimentos descritos abaixo.

3.5. Separação de monócitos (células CD14⁺) e linfócitos (células CD3⁺) por seleção imunomagnética positiva

Monócitos (células CD14⁺) e linfócitos (células CD3⁺) foram isolados para a realização de alguns experimentos. A purificação foi realizada a partir de CMSP obtidas como descrito acima. Os monócitos foram utilizados para a geração de células dendríticas (descrito abaixo) e os linfócitos para a realização de alguns experimentos para caracterizar a capacidade das DCs em diferenciar subpopulações de linfócitos (descrito abaixo). Foi utilizado o sistema de seleção imunomagnética positiva MACs (CD14 MicroBeads ou CD3 MicroBeads - Miltenyi Biotec). A separação de células foi feita de acordo com as especificações do fabricante. O resultado da separação foi avaliado por meio de citometria de fluxo para determinar a pureza das populações obtidas, sendo que em todos os experimentos foram obtidas populações de monócitos com pureza de 93-97% e linfócitos com pureza de 95-96% (dados não mostrados).

3.6. Avaliação do potencial de produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) nos diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

Após a separação, conforme descrito no item anterior, as CMSP foram contadas, ressuspensas em meio RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino. Após o ajuste para 2×10^6 células/mL estas foram estimuladas com o "kit" de

ativação e expansão de células T (Miltenyi Biotec) contendo esferas recobertas com os anticorpos anti-CD2, anti-CD3 e anti-CD28 durante 72 horas.

Nas últimas 6 horas de cultura as células foram ou não estimuladas com PMA (50ng/ml) e com Ionóforo de cálcio (250ng/ml) na presença de Brefeldina A (1µg/mL). Após esse período as células foram coletadas e processadas para a realização de citometria de fluxo. Outra parte das células foi submetida a estimulação com as esferas e com PMA+Ionoforo de cálcio e cultivadas sem a adição de Brefeldina A. Essas células foram utilizadas para a extração de RNA e seu sobrenadante utilizado para a quantificação das citocinas produzidas em cultura (ELISA).

3.7.Diferenciação e caracterização de células dendríticas a partir de monócitos (células CD14⁺) do sangue periférico

As células CD14⁺ de indivíduos saudáveis obtidas conforme descrito no item anterior foram incubadas por 5 dias com citocinas recombinantes (IL-4 – 50ng/mL e GM-CSF – 50ng/mL – R&D Systems) adicionadas no 1º dia de cultura, com suplementação adicional, nas mesmas concentrações, no dia 3. Após 3 e 5 dias de cultura as células foram avaliadas por microscopia e citometria de fluxo para verificar a diferenciação em células dendríticas. Foi possível observar que após esse período as células adquirem todos os marcadores característicos de células dendríticas (ver figura 8.1 - apêndice).

3.8.Condições e estímulos utilizados nas culturas de DCs derivadas de monócitos.

As células dendríticas derivadas de monócitos foram utilizadas para a realização de diferentes experimentos com o objetivo de avaliar as vias utilizadas para o reconhecimento das células leveduriformes de *P. brasiliensis*, bem como o efeito do estímulo do fungo sobre a expressão de moléculas de superfície e produção de citocinas pelas DCs.

Ainda, as mesmas condições foram utilizadas para avaliar o efeito de DCs estimuladas sobre a diferenciação de linfócitos. Para cada conjunto de experimentos foram utilizadas condições de cultura diferentes, descritas abaixo.

Para avaliar as possíveis vias utilizadas para o reconhecimento das células leveduriformes de *P. brasiliensis* pelas células dendríticas e os receptores envolvidos nesse reconhecimento e sinalização, as células dendríticas foram incubadas com anti-TLR2 (20µg/ml), anti-TLR-4 (20µg/ml) e Laminarina (bloqueio de Dectina-1 - 20 µg/ml) durante 1 hora. Após esse período as células foram então estimuladas com LPS (1µg/mL – agonista de TLR4), Pam3CSK4 (1µg/mL - agonista de TLR2), Curdlan (10µg/mL – agonista de Dectina-1), e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 – razão 1:10), por 30 minutos, após o estímulo as células foram utilizadas para o preparo de lisado (ver abaixo) e avaliadas quanto à fosforilação de proteínas sinalizadoras específicas por western-blotting (ver abaixo).

Para avaliar a expressão de moléculas de superfície e a produção de citocinas intracelulares por ELISA as DCs foram submetidas aos mesmos estímulos descritos acima e cultivadas por 18 horas.

Para os experimentos de cocultura de DCs com linfócitos, após a diferenciação (5 dias) as células foram incubadas com anti-TLR2 (20µg/mL), anti-TLR-4 (20µg/mL) e Laminarina (20 µg/mL) durante 1 hora. Após esse período foram estimuladas com LPS (1µg/mL – agonista de TLR4), Pam3CSK4 (1µg/mL - agonista de TLR2), Curdlan (10µg/mL – agonista de Dectina-1), e com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 – razão 1:10). Após 1 hora de estímulo foram adicionadas às culturas de DCs, linfócitos (células CD3⁺), dos mesmos indivíduos dos quais as DCs foram obtidas, em uma proporção de 1 DC para cada 10 linfócitos (1:10). As coculturas foram mantidas por 7 dias a 37°C em estufa de CO₂ (5%). No sétimo dia (últimas 6 horas) foram adicionados às coculturas brefeldina A (1µg/mL), PMA (50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250ng/mL). Após a incubação parte dos linfócitos foi coletada e utilizada para a marcação de superfície e intracelular por citometria de fluxo (conforme descrito abaixo), enquanto outra parte foi utilizada para extração de RNA e utilizada para reações de qRT-PCR (ver abaixo). Os sobrenadantes das coculturas foram coletados no 7º dia e armazenados a -80°C para posterior análise da produção de citocinas por ELISA.

3.9. Imunofluorescência para análise de células por citometria de fluxo.

Células (DCs ou linfócitos) estimuladas conforme descrito nos itens anteriores foram distribuídas (2 x 10⁵ células/cavidade) em placa de 96 cavidades com fundo em U. Para cada tipo celular foi adicionado um conjunto de anticorpos para marcação de superfície. **DCs:** 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). **Linfócitos:** CD3 (PE-Cy7), CD4 (APC-Cy7), CD25 (PE-Cy7), CD127 (APC). Os anticorpos foram diluídos em 20 µL de PBS-BSA(0,1%)-Azida sódica (0,2mM) (PBS-BSA-A), incubando-se por 30 minutos a 4°C no escuro. Após este período foram adicionados 150 µL de PBS-B-A, centrifugando-se por 10 minutos a 1250 RPM a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas (vórtex), adicionando-se 200 µL de tampão PBS-B-A, seguido de nova centrifugação (10 minutos a 1200 RPM, 4°C). Em seguida as células foram ressuspendidas novamente, sendo adicionados 200 µL de formaldeído 2%, seguido de incubação à temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. As células foram então submetidas a permeabilização para marcação intracelular utilizando-se o tampão de permeabilização apropriado para marcação de citocinas intracelulares (eBioscience). Após 15 minutos de incubação as células foram centrifugadas e foram adicionados os anticorpos para marcação intracelular: **DCs:** IL-1 β (FITC), IL-6 (PE), TNF- α (APC), IL-23 (PECy7), IL12p70 (PE). **Linfócitos:** IFN- γ (FITC), IL-17 (PE), IL-4 (PercP-Cy5.5), IL-22 (APC), IL-9 (PE) e Foxp3 (PE). As células foram então incubadas por 30 minutos a 4°C, sendo então adicionados 150 mL do tampão de permeabilização seguido de 2 lavagens com tampão de lavagem e fixação com paraformaldeído 2%. Após serem transferidas para tubos apropriados e o volume completado para 300 µL, as leituras foram feitas em citômetro de fluxo (FACScanto/Becton & Dickson). A análise dos resultados foi feita em programa específico (FCSExpress – De Novo Software),

sendo analisada a porcentagem de células positivas e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada marcador.

3.10. Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

3.10.1. Extração do RNA total e síntese de cDNA.

O RNA total de CMSPs de pacientes com PCM (FA e FJ) e de indivíduos controle não estimuladas e de parte das DCs (1×10^6 células) submetidas a estímulo com as leveduras de *P. brasiliensis* por 18 horas, foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) conforme instruções do fabricante e quantificado por meio de espectrofotômetro (Nanodrop –Thermo Scientific) com leituras a 260 e 280 nm. As amostras de RNA foram então tratadas para a remoção de DNA genômico. Para tanto, 1 µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,7 µL e foram acrescentados 3,97 µL do mix contendo 2,97 µL de tampão 10x concentrado e 1 µL de DNase (Ambion). Então foi adicionado 0,3 µL 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 1 µL de oligo dT₁₂₋₁₈ e 1 µL de “primers” randômicos (Applied Biosystems). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada rapidamente em gelo. A seguir foram adicionados 18 µL 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 minutos, seguido por incubação a 4°C por 5 minutos. A mistura foi

centrifugada rapidamente, adicionando-se 1 μ L 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.

3.10.2. Protocolo de qRT-PCR

O qRT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, California, USA) utilizando metodologia com corante intercalante SybrGreen. Em cavidades de placas de 100 μ L foram adicionados 3 μ L de cDNA (ou de água no caso do controle negativo), 1 μ L do primer sense e 1 μ L do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 80 pM (previamente titulados - tabela I) e 5 μ L do master mix, contendo dNTP, Taq polimerase, MgCl₂, SybrGreen, e tampão (Absolute SYBRGreen RT-PCR mix, Applied Biosystems). As amostras foram colocadas no aparelho 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 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 foram analisados quanto à expressão do gene de interesse de cada amostra, utilizando como gene normalizador o GAPDH e como amostra de referência o cDNA obtido a partir do RNA de um “pool” de linfócitos ou células dendríticas não estimuladas. Os resultados foram expressos como concentração relativa calculada conforme descrito por Pfaffl (2001)[113] utilizando as eficiências de amplificação de cada “primer”, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct gene Alvo}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct gene referência}}}$$

Onde $E_{\text{gene alvo}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o primer de interesse; $E_{\text{gene referência}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o primer do gene normalizador; $\Delta\text{Ct gene alvo}$ é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene de interesse (pool de linfócitos não estimulados) menos o Ct de amostra para o mesmo gene; $\Delta\text{Ct gene referência}$ é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene normalizador (pool de linfócitos não estimulados) menos o Ct de amostra para o mesmo gene.

Tabela I: Sequência dos “primers” que foram utilizados no qRT-PCR. Desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied).

Gene	Forward primer - 5' → 3'	Reverse primer - 5' → 3'
GAPDH	CCACATCGCTCAGACACCAT	GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT
IL-1 β	CACGATGCACCTGTACGATCA	AGACATCACCAAGCTTTTTTTGCT
IL-4	CTGCAAATCGACACCTATTAATGG	GCACATGCTAGCAGGAAGAACA
IL-6	GGTACATCCTCGACGGCATCT	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
IL-9	CCTGGACATCAACTTCCTCATCA	CAGAGACAACCTGGTCACATTAGCA
IL-10	GGCCAGGGCAGCCAGTCT	TCGAAGCATGTTAGGCAGGTT
IL-12p35	CCTGGACCACCTCAGTTTGG	TGAAGGCATGGGAACATTCC
IL-17	AATCTCCACCGCAATGAGGA	ACGTTCCCATCAGCGTTGA
IL-22	GCAGGCTTGACAAGTCCAAC	GCCTCCTTAGCCAGCATGAA
IL-23p19	CTCAGTGCCAGCAGCTTTCAC	TCTCTTAGATCCATGTGTCCCACTAG
IFN- γ	CTAATTATTCGGTAACTGACTTGA	ACAGTTCAGCCATCACTTGGA
TGF- β	TGAGGGCTTTCGCCTTAGC	CGGTAGTGAACCCGTTGATGT
TNF- α	TGGCCCAGGCAGTCAGA	GGTTTGCTACAACATGGGCTACA
Ahr	CAGTTTATTCATGCAGCTGATATGCT	CCGGAAAACATCATGCCACT
FoxP3	GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC	ATGGCCCAGCGGATGAG
GATA-3	AAGACATCCAGACCAGAAAC	GTAAACGAGCTGTTCTTGGG
PU.1	GCCCTATGACACGGATCTATAC	GTAATGGTCGCTATGGCTCTC
ROR γ t	AGAGGGACTCCTTGCCTCTC	CAGCATCTGCTCACTTCCAA
T-bet	GCGCCAGGAAGTTTCATTT	CATTCTGGTAGGCAGTCACG

3.11. Western-blot/imunoblot

3.11.1. Preparação do lisado de células dendríticas

Após o estímulo, as células dendríticas foram coletadas, transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL, centrifugadas (sendo o sobrenadante completamente removido) e as células foram lisadas em tampão RIPA (PBS-Igepal (1%)-deoxicolato de sódio (0,5%)-SDS (0,1%) gelado, acrescido no momento do uso de inibidores de protease (aprotinina a 50 kIU/mL, PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) a 100µg/mL, ortovanadato de sódio – Na₃VO₄ a 1mM)) e coquetel inibidor de fosfatase (Sigma) 5 µL/mL. Após 30 minutos de incubação em gelo os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 *g* a 4°C para a remoção dos restos celulares e o sobrenadante transferido para outro tubo. Após esse procedimento, a quantidade de proteína obtida em cada amostra foi avaliada pelo método de Lowry conforme instruções do fabricante do reagente (BioAgency). Após a quantificação as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.11.2. SDS-PAGE e western-blotting

Para a separação das frações protéicas dos lisados de células obtidos conforme descrito no item anterior, os mesmos foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida-bisacrilamida (10% - 0,75mm de espessura) na presença de SDS. Para cada poço foi utilizada uma concentração de 30 µg de proteína total. Antes da eletroforese os lisados diluídos para a concentração de uso e foram desnaturados pela adição de um tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8-glicerol (25%)-SDS (0,5%)-azul de bromofenol-mercaptoetanol (10%)) e aquecidos

em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Cada um dos lisados foi aplicado em um poço diferente e submetido à eletroforese em cuba vertical (BioRad), à voltagem constante de 100V, por aproximadamente 90 minutos. Para a determinação do peso molecular das bandas marcadas no imunoblot, foi utilizado um padrão de peso molecular, reconhecido pelo anticorpo secundário utilizado na técnica (Cruz Marker – Santa Cruz). Após a eletroforese em gel, os mesmos foram utilizados para a transferência (western-blotting) das frações protéicas para membranas de PVDF – (Polyvinylidene fluoride - poros de 0,22µm – Bio Rad) por meio de eletroforese em voltagem constante de 100 V por 1 hora. Após a transferência as membranas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.11.3. Imunoblot

Após os procedimentos descritos acima, as membranas foram submetidas à reação de imunoblot, utilizando-se anticorpos específicos (para proteínas não fosforiladas e fosforiladas) previamente titulados. Para o imunoblot as membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com salina tamponada com Tris (TBS) adicionado de 1% (peso/volume) de BSA e 0,05% de Tween 20. Após lavagem as membranas foram incubadas por uma noite com anticorpos contra proteínas fosforiladas (anti-pERK, anti-pAKT, anti-pSyk, anti-pp38 ou anti-pJNK) diluídos em TBS-Tween-20 (0,05%)-BSA 1%, sob constante agitação. Após a incubação as membranas foram transferidas para cassetes plásticos e a reação foi realizada no equipamento Snap-ID (Millipore). As membranas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) diluído em TBS-T-BSA por 60 minutos a temperatura ambiente. As

membranas foram então lavadas e mergulhadas em solução contendo Luminol (Santa Cruz Biotechnology) por 1 minuto, após o qual o excesso de tampão foi retirado. Após a revelação, as membranas foram fotografadas e analisadas por equipamento específico para análise de quimioluminescência (ImageQuant 350 GE Life Science). A avaliação da formação de bandas específicas foi realizada após a captura da imagem utilizando o software ImageQuant TL. Após a reação com anticorpos fosforilados foi realizada a remoção dos anticorpos da primeira reação de imunoblot (“stripping”) por meio de duas lavagens em tampão TBS contendo 10% SDS e 1% v/v de Tween 20) por 10 minutos cada a temperatura ambiente, seguidas por lavagens em PBS e TBS contendo 0.05% Tween 20. Após as lavagens as membranas foram novamente incubadas com o tampão de bloqueio e foram submetidas à marcação com anticorpos contra as proteínas não fosforiladas (anti-ERK, anti-AKT, anti-Syk, anti-p38 ou anti-JNK). Após essa etapa e novo “stripping” as membranas foram submetidas à nova marcação para detecção de actina (controle endógeno) com o intuito de garantir maior precisão na análise dos resultados obtidos. As etapas de incubação com anticorpo secundário e revelação foram idênticas as descritas para as proteínas fosforiladas.

Após a aquisição das imagens as mesmas foram analisadas com o intuito de semi-quantificar a fosforilação sofrida pelas proteínas em cada amostra. A semi-quantificação foi feita em software específico (ImageQuant TL – GE Linfe Sciences), por meio da normalização da intensidade (em pixels) da banda obtida com o anticorpo anti-proteína fosforilada, pela intensidade da banda obtida com o anticorpo anti-actina.

3.12. Análise estatística

Para avaliar se a distribuição dos dados permitia o uso de testes paramétricos, os mesmos foram primeiramente avaliados pelo teste estatístico de Kolmogorof-Smirnoff, o qual demonstrou que os dados apresentavam distribuição normal. Os resultados foram então analisados com testes paramétricos e estão representados como média $\pm$ SEM. Para a comparação dos diferentes parâmetros (estímulos) dentro de um mesmo grupo foi utilizado o teste de ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. Para a comparação de um mesmo parâmetro em grupos diferentes (pacientes vs. controle) foi utilizado o teste t de Student. Foram considerados significativos resultados com $p \leq 0,05$.

A decorative graphic featuring several teal circles of varying sizes, some with a gradient and a dark teal outline. A large, thick, dark teal ring is positioned in the lower half of the page, framing the word 'RESULTADOS'. A vertical teal line is on the right side, and a horizontal teal bar is at the bottom left.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise do efeito da estimulação com células leveduriformes de *P. brasiliensis* e agonistas específicos para TLRs e Dectina-1 sobre o fenótipo das DCs derivadas de monócitos

Um dos objetivos do projeto foi a avaliação da interação entre células dendríticas (DCs) e células leveduriformes de *P. brasiliensis*, de que forma ela ocorre, e se essa interação leva a maturação dessas células e o possível direcionamento da resposta imunológica adaptativa subsequente.

Em um primeiro momento analisamos através de citometria de fluxo a expressão de marcadores relacionados à maturação das células dendríticas e a sua capacidade de apresentação de antígenos. Foram analisadas DCs derivadas de monócitos de indivíduos do grupo controle. As DCs foram estimuladas por 18 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18). Os resultados demonstraram que o estímulo com o fungo levou a mudanças fenotípicas nas células dendríticas e que essas alterações podem ser relacionadas ao processo de maturação das DCs (figuras 4.1 e 4.2). Também é possível observar que o estímulo das DCs com os agonistas específicos para TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS) e Dectina-1 (Curdlan) levam a alterações no fenótipo das células dendríticas.

Como pode ser observado na figura abaixo, os estímulos não levaram a alteração na expressão de CD11c (figura 4.1A). Já a expressão de CD11b diminuiu (figura 4.1B) após o estímulo com as células leveduriformes e após o estímulo com o agonista de Dectina-1 (Curdlan). Também pudemos observar um aumento na porcentagem de DCs expressando o marcador CD83 (figura 4.1C) em DCs

submetidas a todos os estímulos e do receptor de quimiocina CCR7 (figura 4.1D) após o estímulo com LPS, Curdlan e com as células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Em relação à expressão do receptor de fagocitose CD209 (DC-Sign - figura 4.1E), todos os estímulos utilizados levaram à diminuição de sua expressão. Já a expressão de CD1a foi bastante variável, não havendo diferenças significativas (figura 4.1F).

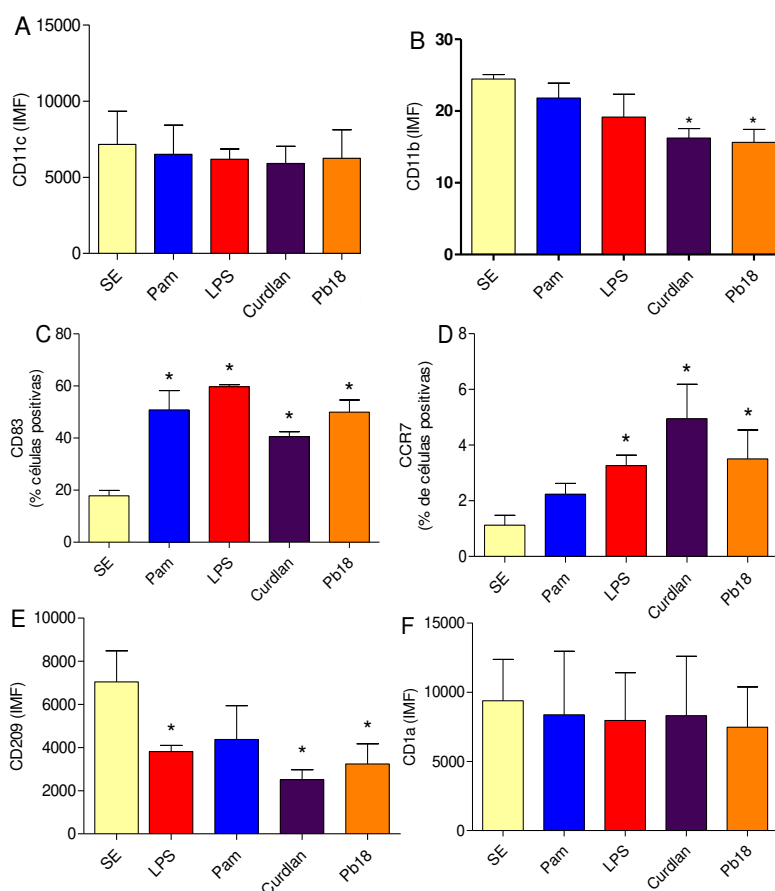


Figura 4.1: Avaliação da ativação de DCs por Pb18 ou agonistas de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1. Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas positivas para CD83 (C), CCR7 (D) ou da intensidade média de fluorescência para marcação com CD11c (MFI - A), CD11b (MFI - B), CD209 (MFI - E) e CD1a (MFI - F). DCs derivadas de monócitos de controle (n=6), foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimulados por 18 horas com LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 - razão 1:10). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas (SE)

Em relação às moléculas relacionadas à apresentação de antígenos e coestimulação de linfócitos (MHC de classe II, CD80 e CD86), os resultados demonstraram que todos os estímulos levam a um aumento de expressão de MHC de classe II (HLA-DR) nas células dendríticas (figura 4.2A), o mesmo ocorrendo quanto à expressão de CD80 (figura 4.2B). Entretanto, não observamos alteração na porcentagem de células positivas para CD86 quando as DCs foram estimuladas com as células leveduriformes do fungo, havendo aumento dessa molécula apenas quando as células foram estimuladas com LPS e Curdlan (figura 4.2C).

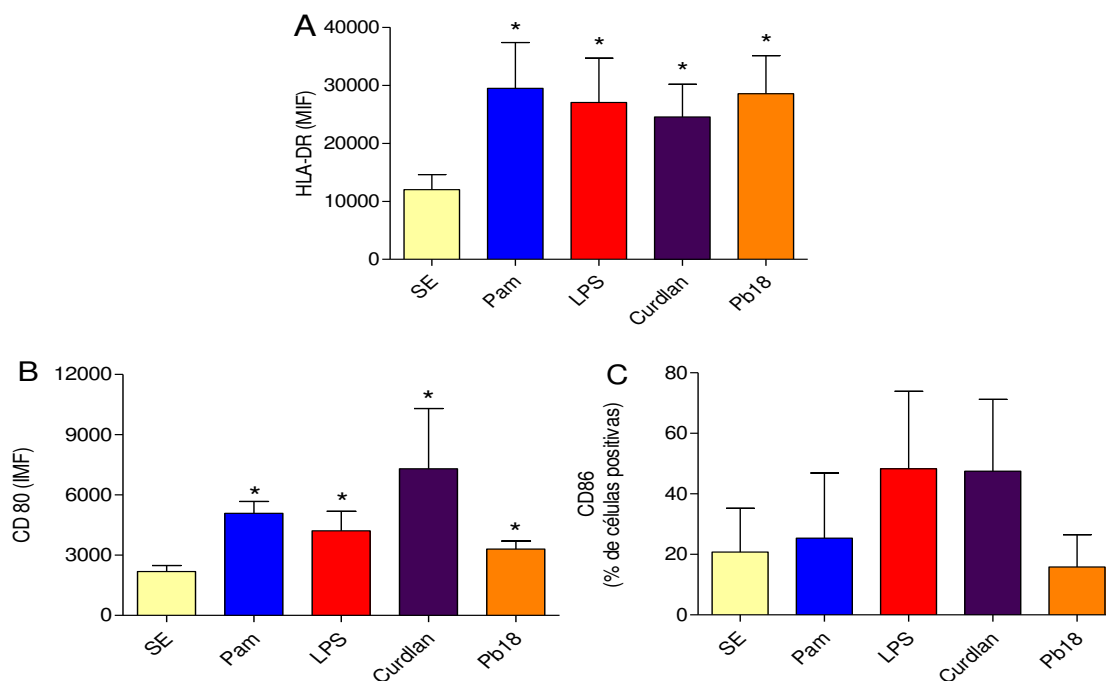


Figura 4.2: Análise de moléculas de ativação em DCs estimuladas com Pb18 ou agonistas de TLR-2, TLR-4 ou Dectina-1: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas positivas para CD86 (**C**) ou da intensidade média de fluorescência para marcação com HLA-DR (MFI - **A**) e CD80 (MFI - **B**). DCs derivadas de monócitos de controle (n=6), foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 - razão 1:10). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas (SE).

Também analisamos se o estímulo com as células leveduriformes do fungo leva a alterações na expressão dos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1. É possível observar que houve um pequeno aumento na porcentagem de células positivas para TLR-2 após o estímulo com as células leveduriformes e com Curdlan (figura 4.3A), mas não houve alteração na expressão de TLR-4 (Figura 4.3B). Também é possível observar que a estimulação das DCs com leveduras de *P. brasiliensis* ou Curdlan levou a uma diminuição importante no número de células positivas para Dectina-1 (figura 4.3C).

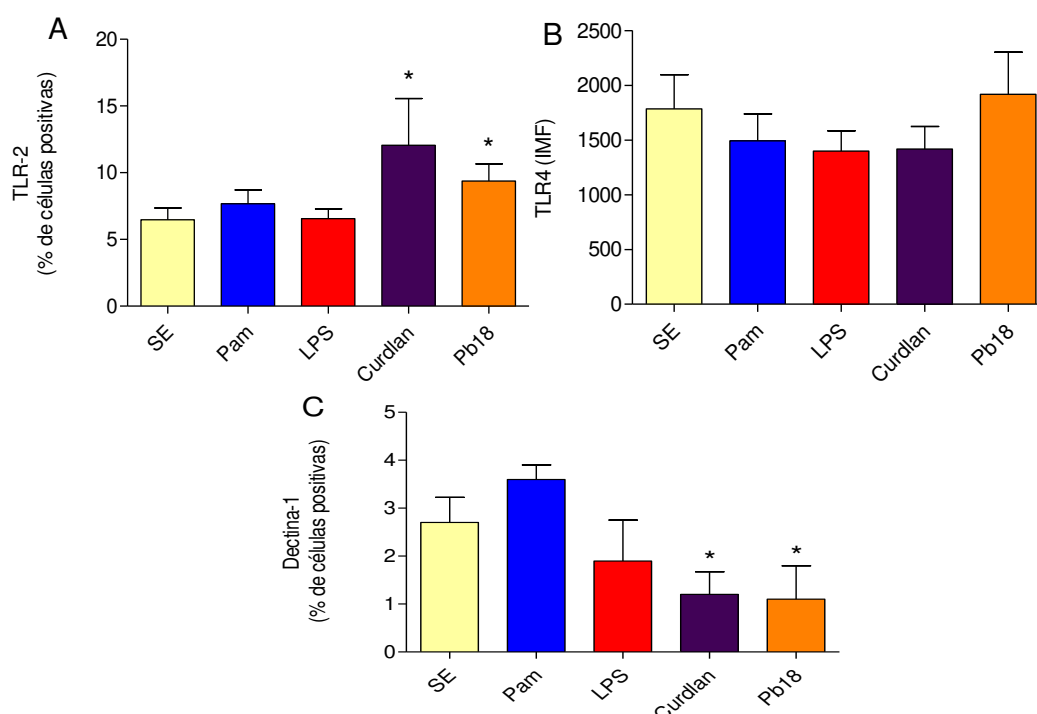


Figura 4.3: Avaliação da expressão de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na superfície de DCs estimuladas com Pb18 ou agonistas de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas positivas para TLR2 (A) e Dectina-1 (C), e da intensidade média de fluorescência para marcação com TLR4 (MFI - B). DCs derivadas de monócitos de controle (n=6), foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimulados por 18 horas com LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 - razão 1:10). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas (SE).

4.2. Análise do efeito da estimulação de células dendríticas (DCs) com células leveduriformes de *P. brasiliensis* sobre a expressão do RNAm para citocinas.

Tendo em vista os resultados descritos acima, que demonstram que o estímulo com células leveduriformes de *P. brasiliensis* leva à maturação das células dendríticas e ao aumento de sua capacidade de apresentação de antígenos, decidimos avaliar se esse mesmo estímulo leva à produção de citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos. Abaixo são mostrados os resultados obtidos com a análise do RNAm para algumas citocinas.

Em relação à expressão do RNAm para IL12p35 pudemos observar que as DCs quando expostas às células leveduriformes do fungo aumentam de maneira considerável a transcrição desse RNAm (figura 4.4A). O mesmo ocorrendo quanto à expressão do RNAm para IL23p19 (figura 4.4B).

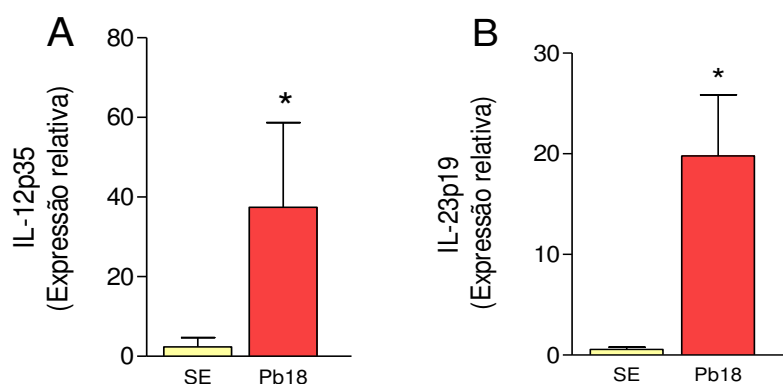


Figura 4.4: Quantificação relativa da expressão de RNAm para IL-12p35 e IL-23p19: Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL-12p35 (A) e IL-23p19 (B) em células dendríticas. DCs derivadas de monócitos de indivíduos controle (n=13) foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18). Teste estatístico: Teste *t* de Student. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas.

Em relação ao RNAm para outras citocinas (TGF- β , IL-6, IL-1 β e TNF- α) importantes para a diferenciação de células Th17, observamos que o estímulo com células leveduriformes de *P. brasiliensis* aumenta a expressão de modo significativo do RNAm para essas citocinas (figura 4.5).

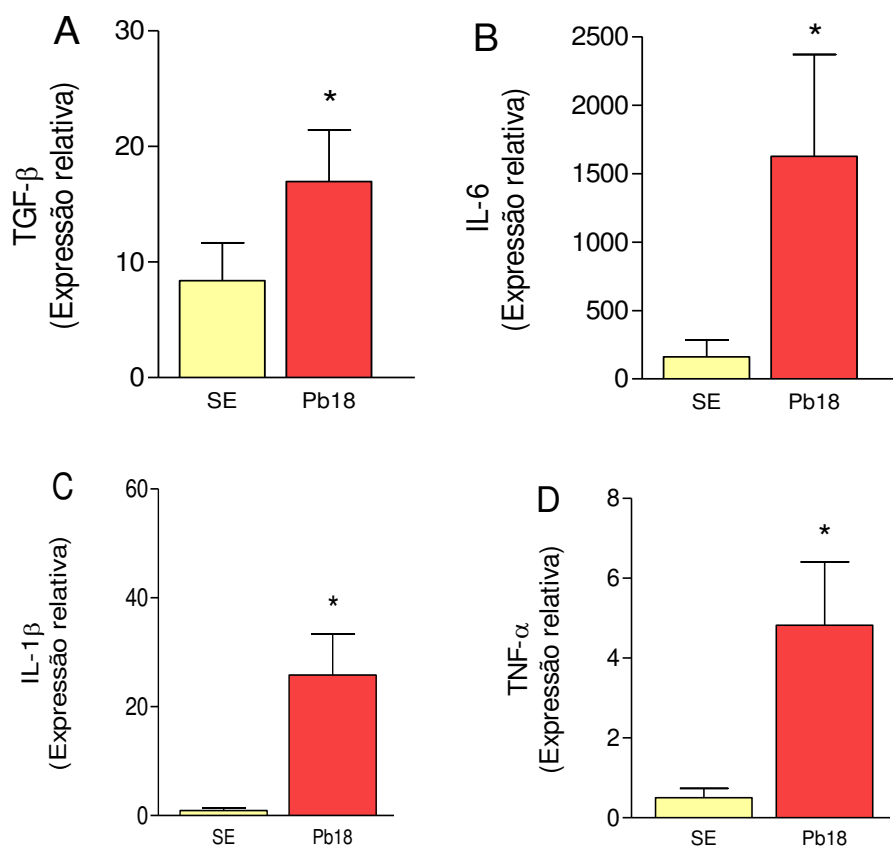


Figura 4.5: Quantificação da expressão do RNAm para citocinas em DCs estimuladas com Pb18: Quantificação relativa da expressão do RNAm para TGF- β (A), IL6 (B), IL1 β (C) e TNF- α (D) em células dendríticas. DCs derivadas de monócitos de controle (n=7) foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18). Teste estatístico: Teste *t* de Student. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas.

4.3. Análise por citometria de fluxo da produção de citocinas por DCs derivadas de monócitos

Como demonstrado acima, o estímulo de células dendríticas com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* induz a expressão de do RNAm para citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos. Decidimos então avaliar por citometria de fluxo a produção dessas citocinas por células dendríticas estimuladas com as células leveduriformes de *P. brasiliensis*, assim como com os agonistas específicos de TLRs (TLR2 e TLR4) e Dectina-1. Em relação à produção de IL12p70 (figura 4.6A), observamos que apesar de haver uma porcentagem pequena de células positivas para essa citocina, todos os estímulos levaram a um aumento na sua produção. Quanto à produção de IL-23p19, observamos que o estímulo com LPS e Curdlan, induziu a produção de uma grande quantidade dessa citocina, e que o estímulo com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* também leva a um aumento de células positivas em comparação às células não estimuladas (figura 4.6B).

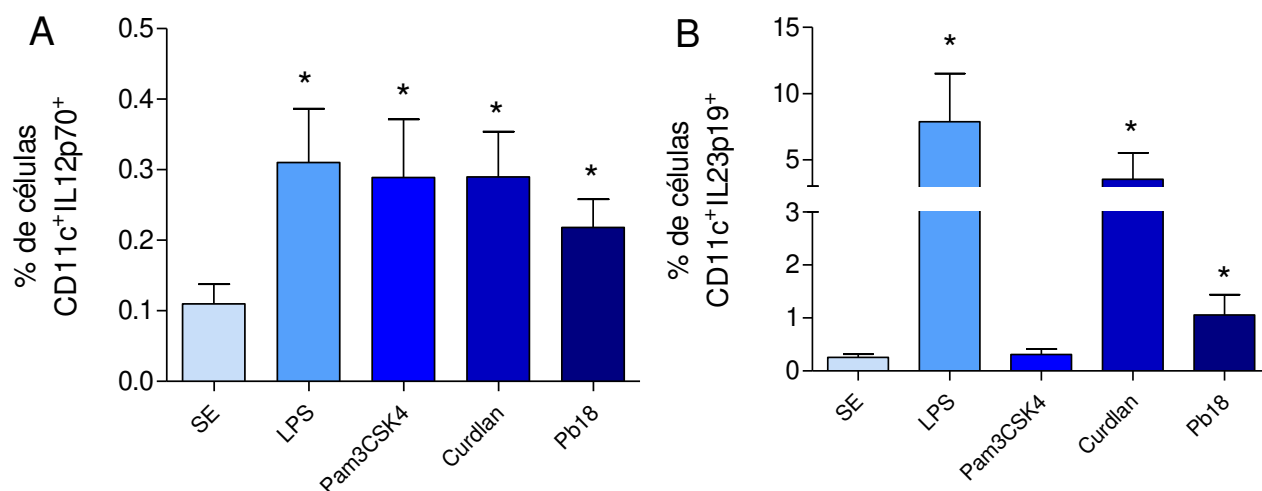


Figura 4.6: Análise da produção de IL-23 e IL-12 por DCs estimuladas com agonistas de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas (CD11c⁺) positivas para IL12p70 (A) e IL23p19 (B). DCs derivadas de monócitos de controle (n=11), foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com LPS (1μg/mL), Curdlan (10μg/mL), Pam3CSK4 (1μg/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 - razão 1:10). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * p≤0,05 em relação às células não estimuladas (SE).

Em relação às citocinas importantes na diferenciação de células Th17 (TGF-β, IL1β, IL-6 e TNF-α), observamos diferenças marcantes quando utilizamos estímulos diferentes (figura 4.7). A porcentagem de células positivas para TGF-β aumentou com todos os estímulos, sendo o maior aumento detectado quando as células foram estimuladas com o agonista de TLR2 (Pam3CSK4), havendo também um aumento importante após o estímulo com a cepa Pb18 (figura 4.7A). A produção de IL-6 foi maior nas células estimuladas com LPS, Pam3CSK4 e com Curdlan, havendo pouca produção após o estímulo com as leveduras de *P. brasiliensis* (figura 4.7B). Já a porcentagem de células positivas para IL-1β aumentou com todos os estímulos (exceto Pam3CSK4), notadamente após o estímulo com Curdlan e com LPS (figura 4.7C). Assim como para IL-6, a produção de TNF-α também foi maior quando as células foram estimuladas com LPS ou

com Curdlan, havendo também uma maior porcentagem de células positivas quando as células foram estimuladas com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* (figura 4.7D).

Também avaliamos a produção da citocina supressora IL-10 (figura 4.7E), e observamos que as DCs submetidas a todos os estímulos (exceto Curdlan), aumentam a produção dessa citocina (embora não tenhamos conseguido observar diferenças estatisticamente significativas).

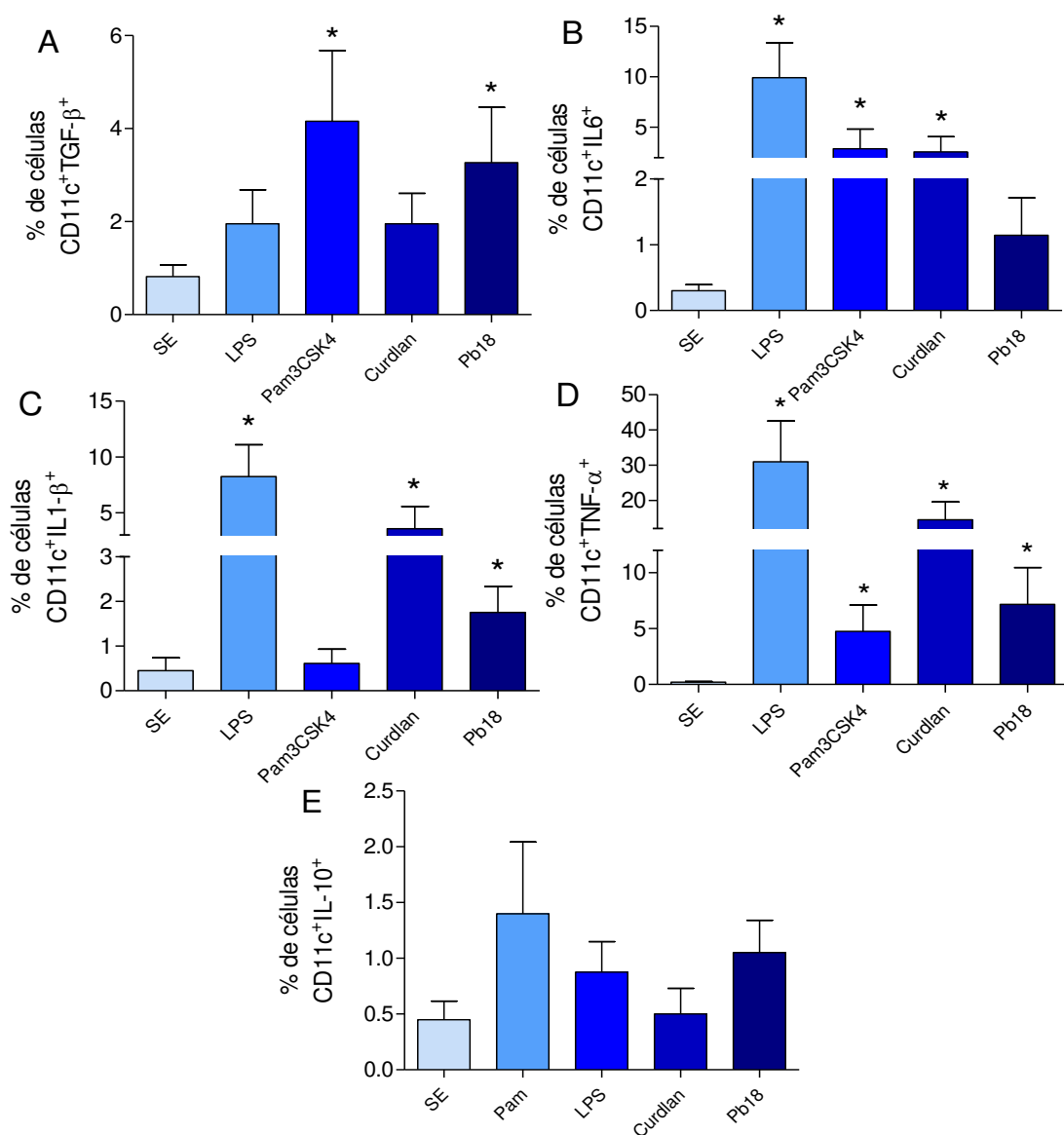


Figura 4.7 (página anterior): Expressão de citocinas por células dendríticas CD11C⁺: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas (CD11C⁺) positivas para TGF- β (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D) e IL-10 (E). DCs derivadas de monócitos de controle (n=11), foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com LPS (1 μ g/mL), Curdlan (10 μ g/mL), Pam3CSK4 (1 μ g/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 - razão 1:10). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas (SE).

4.4. Análise do perfil de linfócitos diferenciados na presença de DCs submetidas a diferentes estímulos.

Após realizarmos os experimentos descritos acima, decidimos avaliar se as DCs estimuladas com os agonistas específicos de TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS) e Dectina-1 (Curdlan), assim como com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* induzem a diferenciação de linfócitos T autólogos. Para isso foram utilizadas DCs derivadas de monócitos conforme descrito anteriormente, estimuladas com agonistas específicos de TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS) e Dectina-1 (Curdlan), assim como células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18).

Os resultados desses testes demonstraram que DCs estimuladas com células leveduriformes são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos em células produtoras de IL-17, IL-22, IFN- γ e IL-4 (figuras 4.8 a 4.11).

De maneira geral, o estímulo de DCs com LPS (agonista de TLR4) induziu uma grande produção de IFN- γ , com baixa produção de IL-17, IL-22 e IL-4 (figura 4.10). O estímulo com Pam3CSK4 (agonista de TLR2) também induziu a diferenciação de células produtoras de IFN- γ embora em menor escala que o estímulo com LPS, mas também induziu uma produção considerável de IL-4 pelos

linfócitos (superior aos outros estímulos). Já o estímulo com Curdlan (agonista de Dectina-1) foi o que induziu a produção de IL-17 em níveis mais expressivos (em níveis superiores aos de IFN- γ), assim como de IL-22. As células leveduriformes de *P.brasiliensis*, por sua vez, induziram a produção de citocinas com um perfil muito parecido ao observado com o estímulo com Curdlan (alta produção de IL-17 e IL-22, com produção menor de IFN- γ), embora esse estímulo também tenha induzido a produção de IL-4 em níveis comparados ao estímulo dado por Pam3CSK4.

Por meio da análise por citometria com 6 fluorocromos pudemos distinguir a existência de várias populações de linfócitos, após as coculturas com DCs. Assim, identificamos linfócitos produtores apenas de IFN- γ , somente IL-17, uma população produtora de IFN- γ e IL-17, uma pequena população produtora de apenas IL-22 e uma população produtora de IL-17 e IL-22 (ver dot-plots representativos nas figuras 4.8 e 4.9).

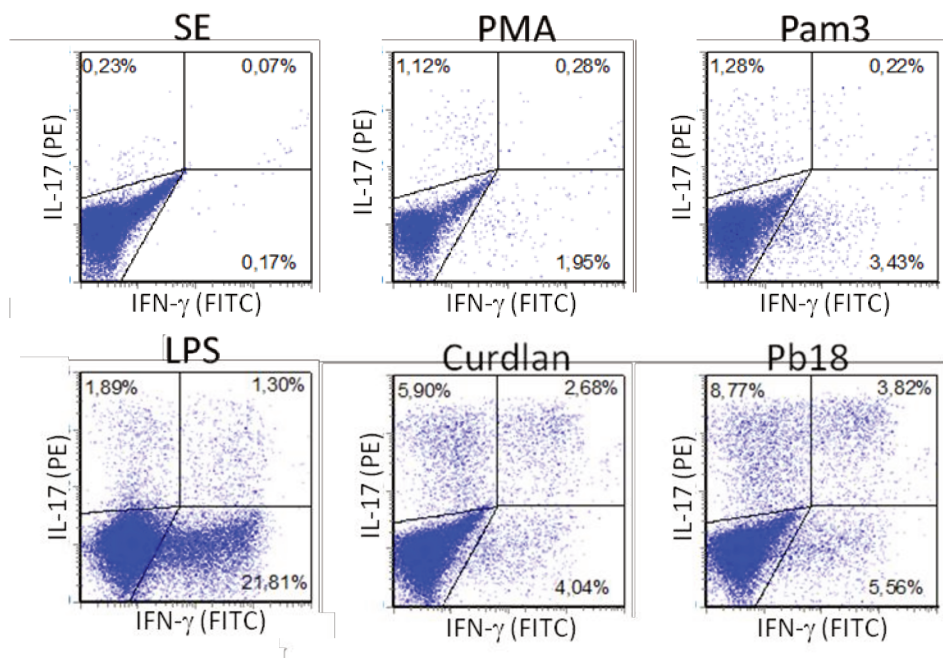


Figura 4.8: Representação dos gráficos obtidos da análise de linfócitos produtores de IFN- γ e IL-17: "Dot-plots" representativos da análise por citometria de fluxo da produção de IFN- γ e IL17 por linfócitos T CD3⁺CD4⁺ mantidos por 7 dias em coculturas com células dendríticas não estimuladas (SE) ou estimuladas com Pam3CSK4 (Pam3), LPS, Curdlan e células leveduriformes de *P. brasiliensis*, o estímulo com PMA foi utilizado como controle de ativação dos linfócitos. A análise foi realizada com "gates" na região de linfócitos, em células CD3⁺CD4⁺. Pode-se observar que os estímulos levam a diferenciação de linfócitos produtores apenas de IL-17 (quadrante superior esquerdo), de IFN- γ (quadrante inferior direito) ou duplo positivos (quadrante superior direito). Os números em cada quadrante indicam o número de células positivas.

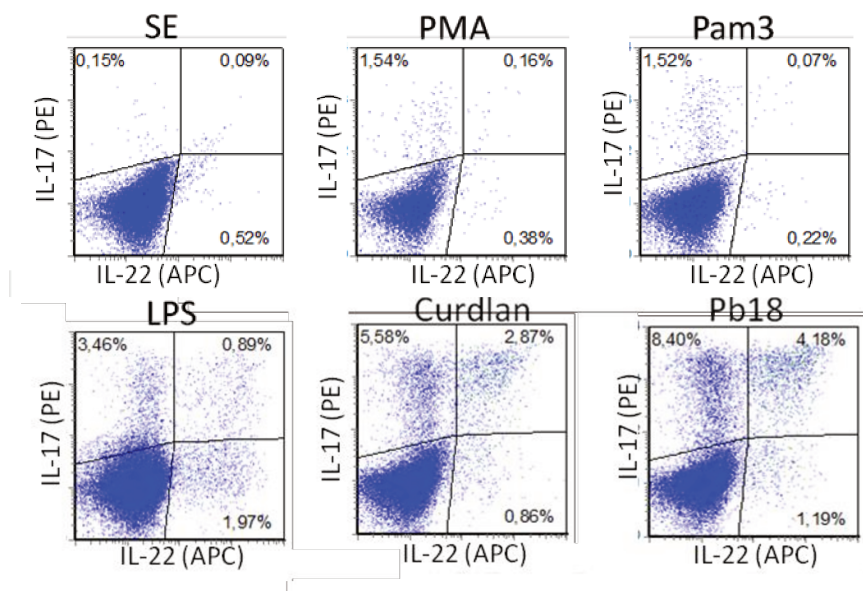


Figura 4.9: Representação dos gráficos obtidos da análise de linfócitos produtores de IL-17 e IL-22: "Dot-plots" representativos da análise por citometria de fluxo da produção de IL-22 e IL-17 por linfócitos T CD3⁺CD4⁺ mantidos por 7 dias em coculturas com células dendríticas não estimuladas (SE) ou estimuladas com Pam3CSK4 (Pam3), LPS, Curdlan e células leveduriformes de *P. brasiliensis*, o estímulo com PMA foi utilizado como controle de ativação dos linfócitos. A análise foi realizada com "gates" na região de linfócitos, em células CD3⁺CD4⁺. Pode-se observar que os estímulos levam a diferenciação de linfócitos produtores apenas de IL-17 (quadrante superior esquerdo), apenas de IL-22 (quadrante inferior direito) ou duplo positivos (quadrante superior direito). Os números em cada quadrante indicam o número de células positivas.

Dessa forma os dados foram analisados e representados em gráficos levando em conta essas diferentes populações (figura 4.10). Note que o estímulo com PMA foi utilizado como controle de ativação. A população produtora somente de IL-17 (células Th17) foi diferenciada quando se utilizou o estímulo Curdlan e Pb18 (figura 4.10A), a população produtora apenas de IFN- γ (células Th1) foi mais expressiva quando as DCs foram estimuladas com LPS (figura 4.10B) (embora o estímulo com Curdlan e com as células leveduriformes também tenha levado ao aparecimento dessa população). A população duplo positiva para IFN- γ e IL-17

também foi melhor observada quando as DCs foram estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* ou com Curdlan (figura 4.10C). O mesmo ocorreu para a população produtora apenas de IL-22 (figura 4.10D). A produção conjunta de IL-17 e IL-22 ocorreu em maior escala quando os linfócitos foram cocultivados com DCs estimuladas com as células leveduriformes do fungo, enquanto que os estímulos com Curdlan e LPS apresentaram efeito similar (figura 4.10E). Em relação à produção de IL-4, apesar do número de células produtoras ser muito pequeno (próximo a 1%), observamos um aumento dessa produção quando as DCs foram estimuladas com células leveduriformes e com Pam3CSK4 (figura 4.10F).

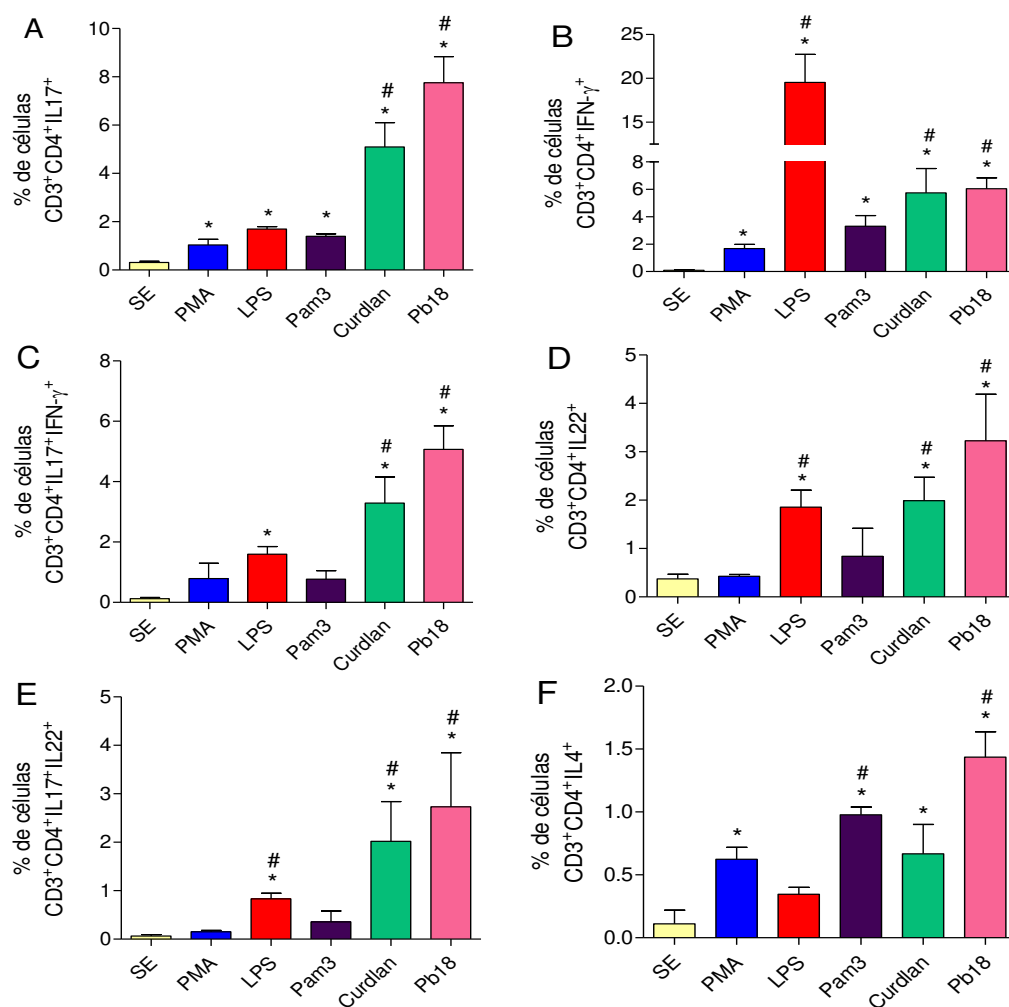


Figura 4.10 (página anterior): Análise das populações de linfócitos produtores de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-22: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de linfócitos CD3⁺CD4⁺IL17⁺ (A), CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (B), CD3⁺CD4⁺IL17⁺IFN- γ ⁺ (C), CD3⁺CD4⁺IL22⁺ (D), CD3⁺CD4⁺IL17⁺IL22⁺ (E), CD3⁺CD4⁺IL4⁺ (F). Os linfócitos foram cocultivados por 7 dias na presença de DCs derivadas de monócitos de indivíduos do grupo controle (n=9), que foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimulados por 18 horas com Pam3CSK4 (Pam3), LPS, Curdlan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18). Estímulo com PMA utilizado como controle de ativação. Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células não estimuladas (SE); # $p \leq 0,05$ em relação às células estimuladas com PMA.

Também fizemos a dosagem das citocinas (IFN- γ , IL-17, IL-22 e IL-4) nos sobrenadantes de coculturas de DCs submetidas a diferentes estímulos e linfócitos. Os resultados demonstraram que a produção de IFN- γ (figura 4.11A) foi maior quando as células foram estimuladas com LPS, Curdlan e células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Quanto à produção de IL-17, observamos um aumento significativo na produção quando as DCs foram estimuladas com Curdlan e Pb18 (figura 4.11B). Em relação à IL-22, não observamos diferenças estatísticas entre os estímulos utilizados, embora os maiores valores tenham sido observados quando as DCs foram estimuladas com Curdlan e Pam3CSK4 (figura 4.11C). Infelizmente, não conseguimos detectar IL-4 nos sobrenadantes de cultura, provavelmente devido à sensibilidade do teste utilizado (dados não mostrados).

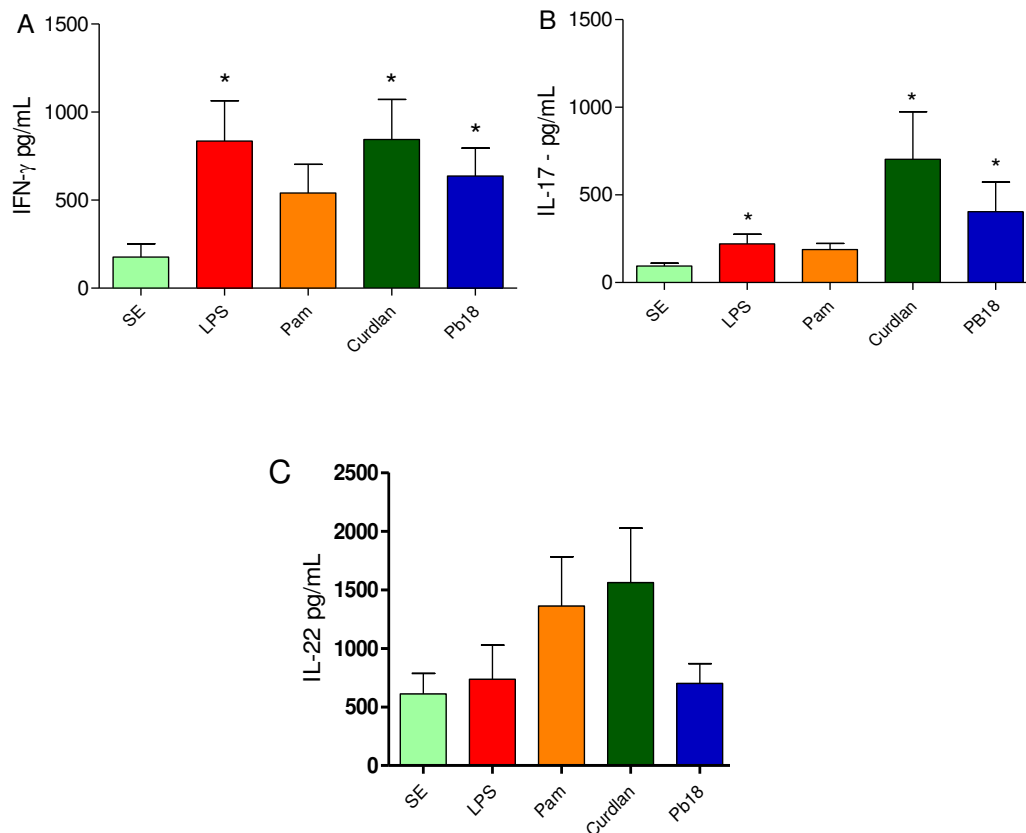


Figura 4.11: Análise da produção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 em sobrenadantes de coculturas de DCs e linfócitos. Análise da produção das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-22 produzidas por linfócitos CD3⁺ cocultivados com células dendríticas estimuladas com LPS (1 μ g/mL), Pam3CSK4 (1 μ g/mL), Curdlan (10 μ g/mL) ou leveduras de *P. brasiliensis* (proporção 1 levedura / 10 células dendríticas). As citocinas foram avaliadas após 7 dias de cultura no sobrenadante de cultura através da técnica de ELISA. Número de amostras 9 (n=9). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * p≤0,05 em relação às células não estimuladas (SE).

4.5. Análise da diferenciação de células regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em coculturas de DCs estimuladas com diferentes ligantes de TLR e células leveduriformes de *P. brasiliensis*

Conforme observado em um trabalho publicado anteriormente pelo nosso grupo, a paracoccidiodomicose ativa é caracterizada por uma população

aumentada de células regulatórias nos indivíduos. Desta forma decidimos investigar se o cocultivo de células dendríticas estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* seria capaz de estimular a geração de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Como é possível observar no gráfico abaixo (figura 4.12), após 7 dias de cultura linfócitos T se diferenciaram em células apresentando o fator de transcrição característico de células regulatórias, Foxp3. As células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foram encontradas em maior número nas coculturas nas quais as DCs haviam sido previamente estimuladas com Pam3CSK4 (agonista de TLR2) e com as células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Observamos o desenvolvimento de células com fenótipo compatível com o de células T regulatórias naturais, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

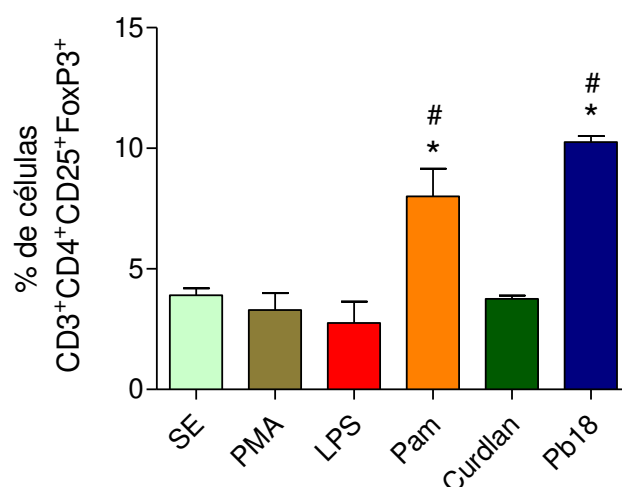


Figura 4.12 – Avaliação do número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ geradas em coculturas de células dendríticas. Os linfócitos foram cocultivados por 7 dias na presença de DCs derivadas de monócitos de indivíduos do grupo controle (n=9), que foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com Pam3CSK4 (Pam3), LPS, Curdlan e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18). Estímulo com PMA utilizado como controle de ativação. Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * p≤0,05 em relação às células não estimuladas (SE); # p≤0,05 em relação às células estimuladas com PMA.

4.6. Efeito do bloqueio da Dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteínas ERK, JNK, p38, Syk e AKT.

Como demonstrado acima, o reconhecimento das células leveduriformes de *P. brasiliensis* pelas DCs, leva a ativação dessas últimas, e à produção de citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos. Também pode-se observar que diferentes estímulos levam a diferentes respostas. Dessa forma decidimos identificar, por meio da fosforilação de proteínas específicas, os receptores envolvidos no reconhecimento das leveduras de *P. brasiliensis*. Para isso utilizamos DCs estimuladas com agonistas específicos de TLR2 (Pam3CSk4), TLR4 (LPS) e Dectina-1 (Curdlan), assim como células leveduriformes de *P. brasiliensis* da cepa Pb18. Para avaliarmos qual o receptor utilizado para o reconhecimento das leveduras, antes de incubarmos as DCs com o fungo, tratamos as mesmas com inibidores específicos dos receptores (anti-TLR2, anti-TLR4 e Laminarina que bloqueia a Dectina-1). Os resultados desses experimentos estão descritos abaixo.

4.6.1. Efeito do bloqueio da Dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína ERK1/2

A ERK é uma proteína quinase da família das MAP quinases, que possui duas isoformas: uma proteína de 44kDa e outra de 42kDa. As proteínas ERK são ativadas através dos TLR-2, TLR-4 e da Dectina-1, e participam de forma importante em infecções fúngicas [114].

Observamos a ativação da ERK 1 de forma expressiva quando as células foram estimuladas com agonista específico de Dectina-1 ou das duas isoformas da proteína quando as DCs são estimuladas com a cepa Pb18. Observamos que o

tratamento com os anticorpos bloqueadores de TLR-2, TLR-4 e o bloqueio com laminarina (Dectina-1) inibem a fosforilação das proteínas ERK1 e ERK2 (figura 4.13).

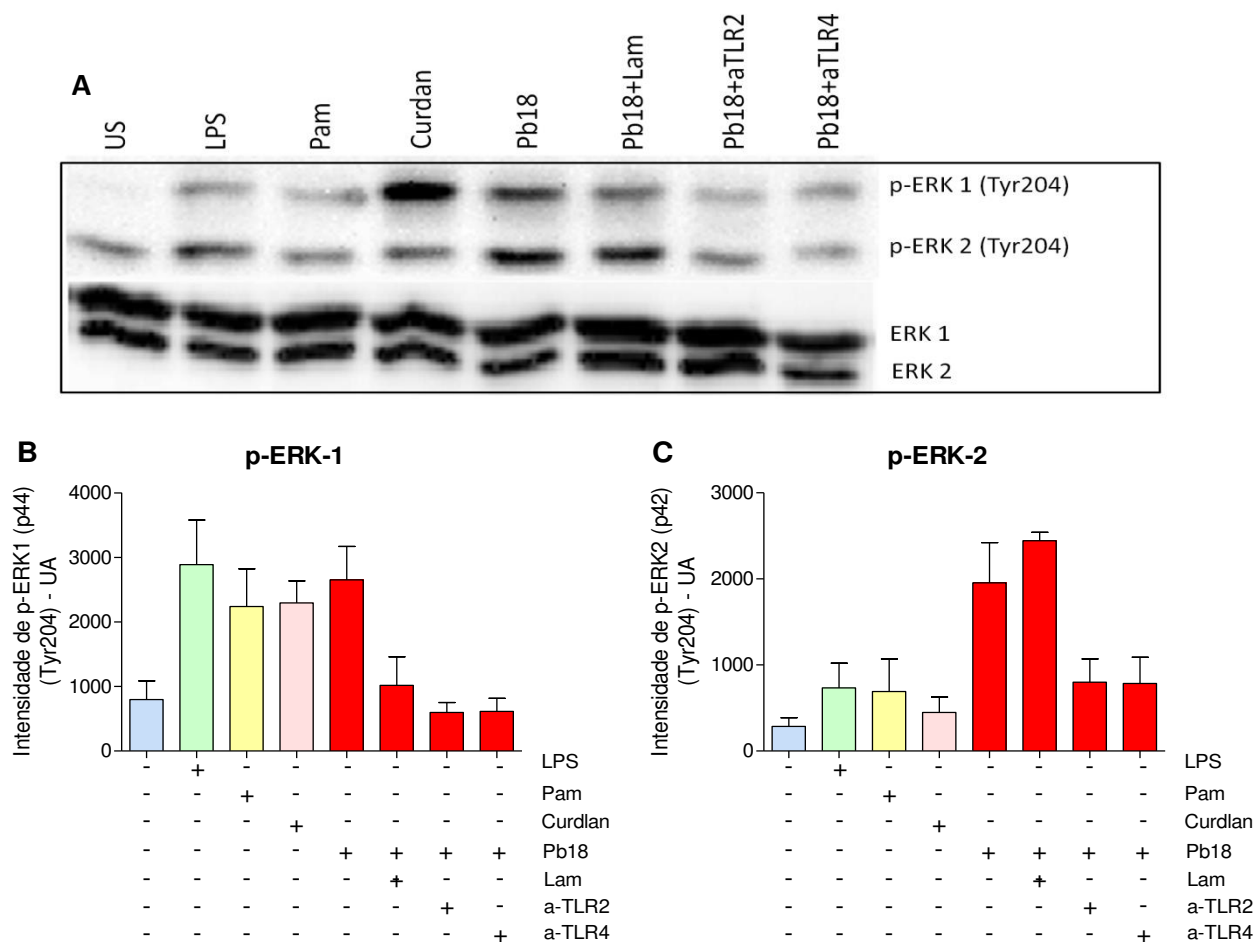


Figura 4.13: Papel do TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na sinalização intracelular via ERK1/2: Análise da fosforilação da proteína ERK 1/2 em DCs não estimuladas e após diferentes estímulos: LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 (razão 1:10) e células estimuladas com leveduras de Pb18 após o bloqueio dos receptores TLR-2 (a-TLR2), TLR-4 (a-TLR4) e Dectina-1 (Laminarina). **A**) Imagem representativa dos resultados obtidos com a análise da fosforilação da proteína ERK 1/2. **B e C** - Análise semi-quantitativa da intensidade das bandas de ERK 1 (B) e ERK 2 (C), a intensidade das bandas obtidas com o uso de anticorpos anti-p-ERK1/2 foram normalizadas pela intensidade das bandas de actina. Número de amostras 4 (n=4).

4.6.2. Efeito do bloqueio da Dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína JNK.

A proteína JNK é ativada após estímulo do TLR-2 e TLR-4. Observamos a ativação da JNK após todos os estímulos utilizados ou quando DCs foram estimuladas com a cepa Pb18. Observamos que o tratamento com os anticorpos para TLR-2 e TLR-4 levam à diminuição da fosforilação da proteína JNK. Enquanto que o bloqueio da Dectina-1 com Laminarina não apresentou esse efeito (figura 4.14).

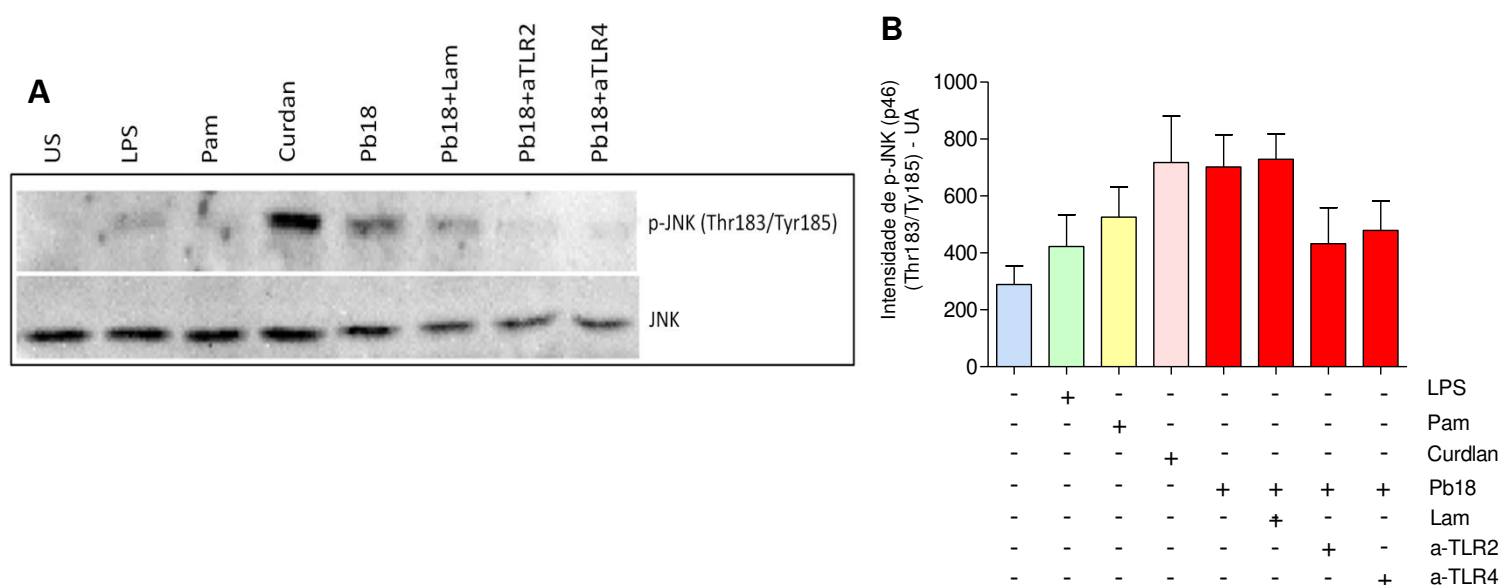


Figura 4.14: Efeitos do bloqueio de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 sobre a sinalização da proteína JNK: Análise da fosforilação da proteína JNK em DCs não estimuladas e após diferentes estímulos: LPS (1 μ g/mL), Curdlan (10 μ g/mL), Pam3CSK4 (1 μ g/mL) e leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 (razão 1:10) e células estimuladas com leveduras de Pb18 após o bloqueio dos receptores TLR-2, TLR-4 e Dectina-1. **A)** Imagem representativa dos resultados obtidos com a análise da fosforilação da proteína JNK. **B)** Análise semi-quantitativa da intensidade das bandas de JNK, a intensidade das bandas obtidas com o uso de anticorpos anti-p-JNK foram normalizadas pela intensidade das bandas de actina. Número de amostras 4 (n=4).

4.6.3. Efeito do bloqueio da Dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína AKT

A AKT é uma proteína quinase que está envolvida na sinalização da via da fosfatidilinositol-3-quinase e é fosforilada quando ativada também através da sinalização via TLR-2 e TLR-4. O estímulo das células dendríticas com o *P. brasiliensis* leva a fosforilação do AKT. Observamos que o bloqueio do TLR-2 e do TLR-4 inibe a fosforilação do AKT. No entanto, outros bloqueios parecem não influenciar a fosforilação dessa proteína como pode ser observado na figura 4.15.

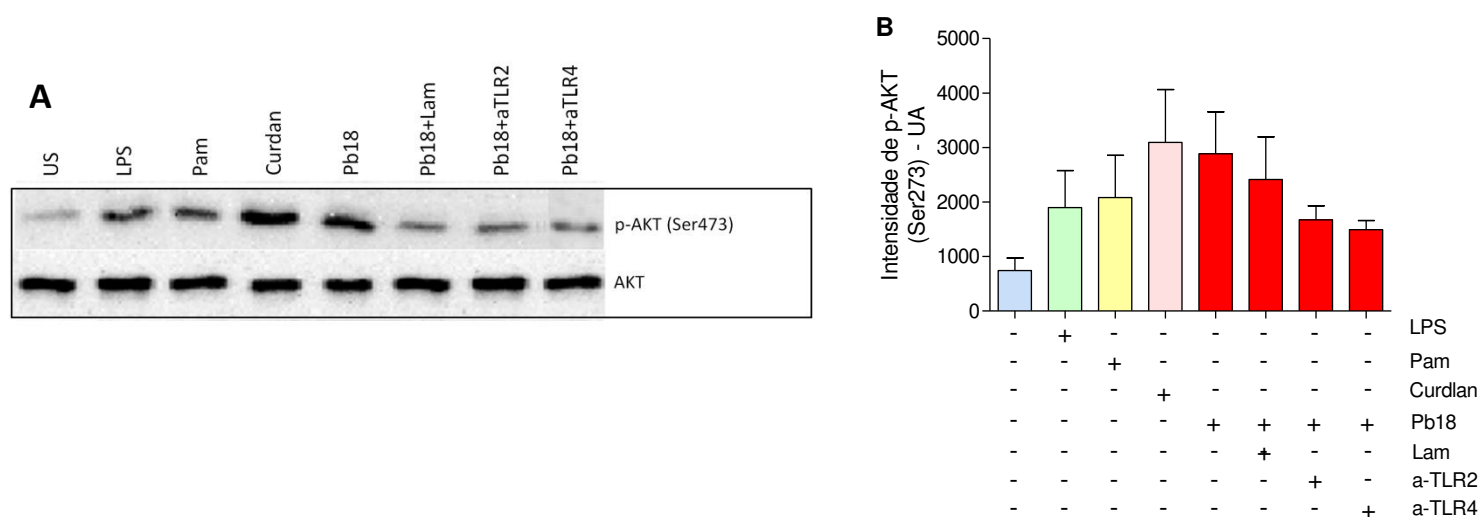


Figura 4.15: Análise do papel dos receptores TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na fosforilação da proteína AKT em células dendríticas estimuladas com Pb18: Análise da fosforilação da proteína AKT em DCs não estimuladas e após diferentes estímulos: LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 (razão 1:10) e células estimuladas com leveduras de Pb18 após o bloqueio dos receptores TLR-2, TLR-4 e dectina-1. **A)** Imagem representativa dos resultados obtidos com a análise da fosforilação da proteína AKT. **B)** Análise semi-quantitativa da intensidade das bandas de AKT, a intensidade das bandas obtidas com o uso de anticorpos anti-p-AKT foram normalizadas pela intensidade das bandas de actina. Número de amostras 4 (n=4).

4.6.4. Efeito do bloqueio da Dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína Syk

A proteína Syk, membro da família das proteínas quinases é fosforilada durante o processo de sinalização intracelular da Dectina-1. Observamos que ocorreu a fosforilação dessa proteína quando as DCs foram estimuladas independente do estímulo, mas os maiores níveis de fosforilação ocorreram quando utilizamos o agonista específico de Dectina-1 (Curdlan) ou com leveduras de *P. brasiliensis*. Como é possível observar, o bloqueio da Dectina-1 leva a diminuição da fosforilação dessa proteína(figura 4.16).

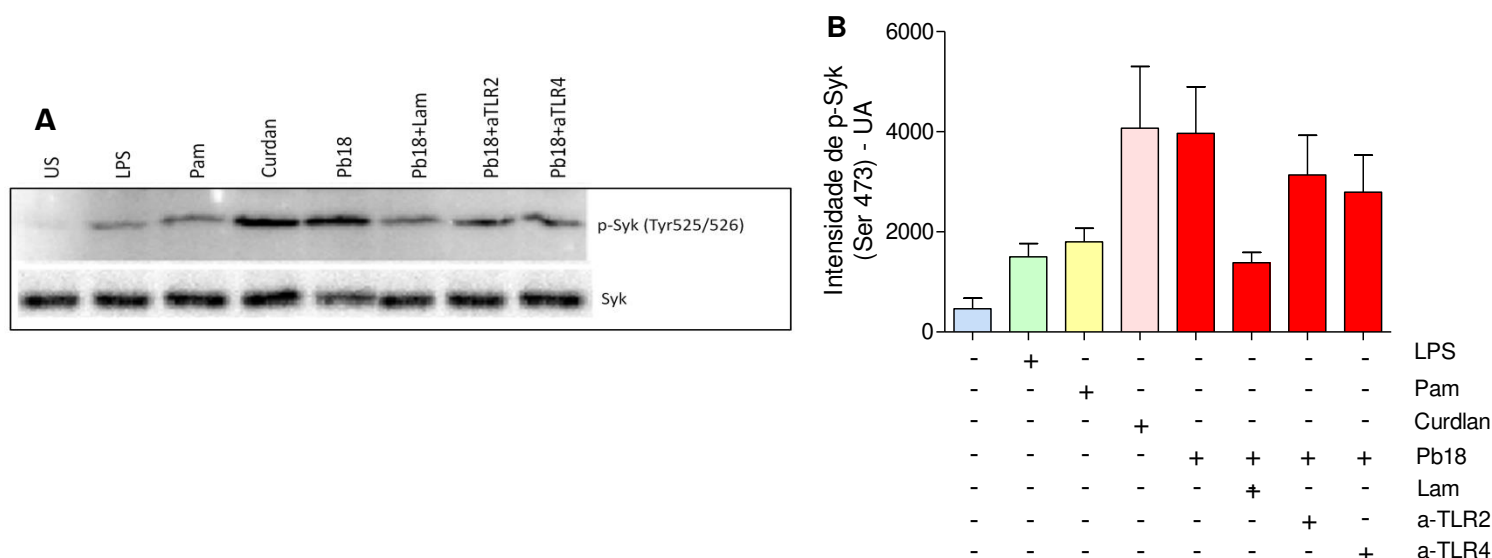


Figura 4.16: Fosforilação da proteína Syk frente a estimulação com Pb18 e bloqueios de TLR2, TLR4 e Dectina-1. Análise da fosforilação da proteína Syk em DCs não estimuladas e após diferentes estímulos: LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 (razão 1:10) e células estimuladas com leveduras de Pb18 após o bloqueio dos receptores TLR-2, TLR-4 e dectina-1. **A)** Imagem representativa dos resultados obtidos com a análise da fosforilação da proteína Syk. **B)** Análise semi-quantitativa da intensidade da bandas de Syk, a intensidade das bandas obtidas com o uso de anticorpos anti-p-Syk foram normalizadas pela intensidade das bandas de actina. Número de amostras 4 (n=4).

4.6.5. Efeito do bloqueio da Dectina-1, dos TLR-2 e TLR-4 sobre a fosforilação da proteína p38

A proteína p38 também é um membro da família das MAP quinases e é fosforilada durante a sinalização estimulada pelo reconhecimento via TLR-2 e TLR-4. Como é possível observar na figura abaixo o estímulo com os agonistas de TLR-2 e ligante de TLR-4 (mas não de Dectina-1) levam a fosforilação da p38. O estímulo com o *P. brasiliensis* também leva a fosforilação da proteína e o bloqueio do TLR-2 e do TLR-4 reduzem a fosforilação da p38. O bloqueio da Dectina-1 não inibe a fosforilação da p38 (figura 4.17).

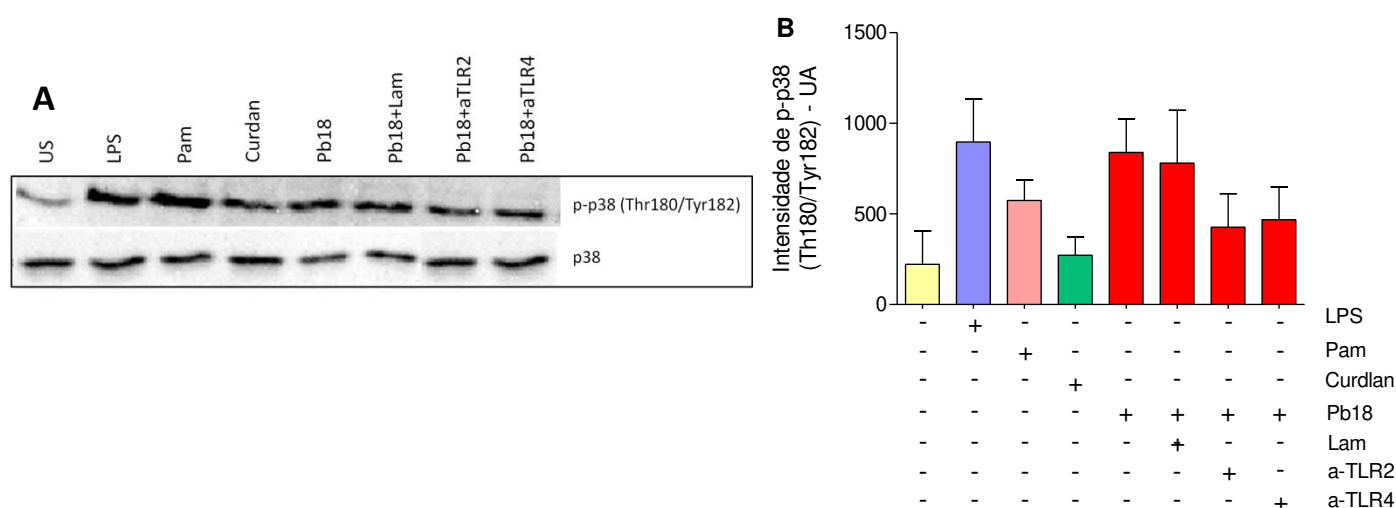


Figura 4.17: Análise da fosforilação da proteína p38 em DCs estimuladas com Pb18 e tratadas com bloqueadores para TLR-2, TLR-4 e Dectina-1. Análise da fosforilação da proteína p38 em DCs não estimuladas e após diferentes estímulos: LPS (1µg/mL), Curdlan (10µg/mL), Pam3CSK4 (1µg/mL) e leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 (razão 1:10) e células estimuladas com leveduras de Pb18 após o bloqueio dos receptores TLR-2, TLR-4 e dectina-1. **A)** Imagem representativa dos resultados obtidos com a análise da fosforilação da proteína p38. **B)** Análise semi-quantitativa da intensidade da bandas de p38, a intensidade das bandas obtidas com o uso de anticorpos anti-p-p38 foram normalizadas pela intensidade das bandas de actina. Número de amostras 4 (n=4).

4.7.Efeito do bloqueio de TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na produção de citocinas por DCs estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*

Como observado acima, o bloqueio específico dos receptores TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 em DCs estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* leva à fosforilação diferencial de proteínas intracelulares. Para verificar se esses bloqueios influenciam a produção de citocinas, realizamos um novo conjunto de experimentos, nos quais antes da estimulação com as células fúngicas as DCs foram incubadas com os bloqueadores específicos de TLR2, TLR4 e Dectina-1.

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.18), não observamos alterações na frequência de células positivas para IL-12p70 após o bloqueio dos receptores específicos (figura 4.18A), contudo a frequência de DCs positivas para IL-23 diminuiu quando utilizamos o bloqueio específico de Dectina-1 e quando combinamos esse bloqueio com o bloqueio dos TLR2 e TLR4 (figura 4.18B).

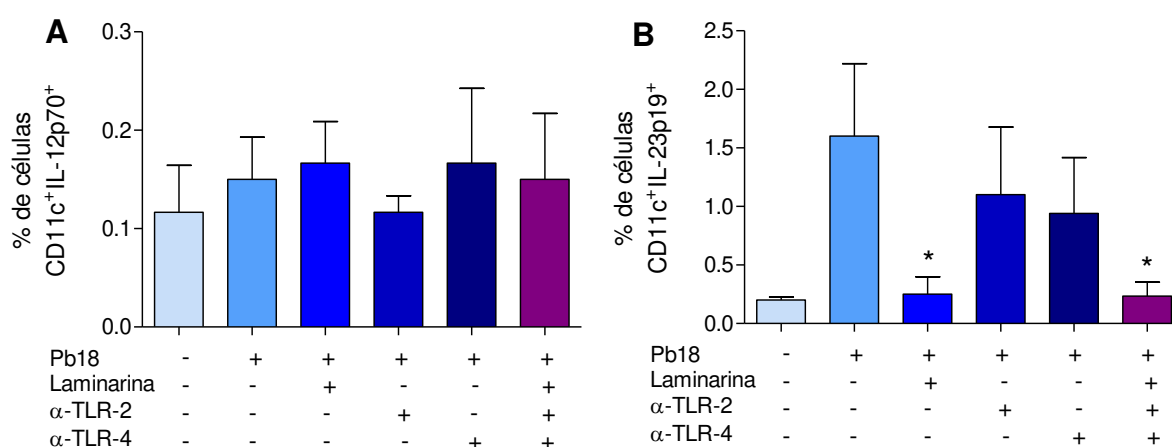


Figura 4.18: Avaliação da produção de IL-12 e IL-23 por DCs previamente tratadas com bloqueadores para TLR2, TLR4 e Dectina-1 e incubadas com leveduras de Pb18: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas (CD11c) positivas para IL12p70 (A) e IL23p19 (B). DCs derivadas de monócitos foram primeiramente incubadas com bloqueadores específicos de dectina-1 (laminarina) e/ou TLR2 e TLR4 (anticorpos bloqueadores) e depois mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 - razão 1:10). Número de amostras 6 (n=6). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

De maneira similar, em relação às outras citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ (TGF- β , IL-6, TNF- α e IL-1 β), pudemos observar que o bloqueio da Dectina-1 leva a uma diminuição significativa na porcentagem de DCs positivas para essas citocinas (exceto para o TGF- β), o mesmo ocorrendo quando as células foram tratadas com uma combinação dos bloqueios (figura 4.19).

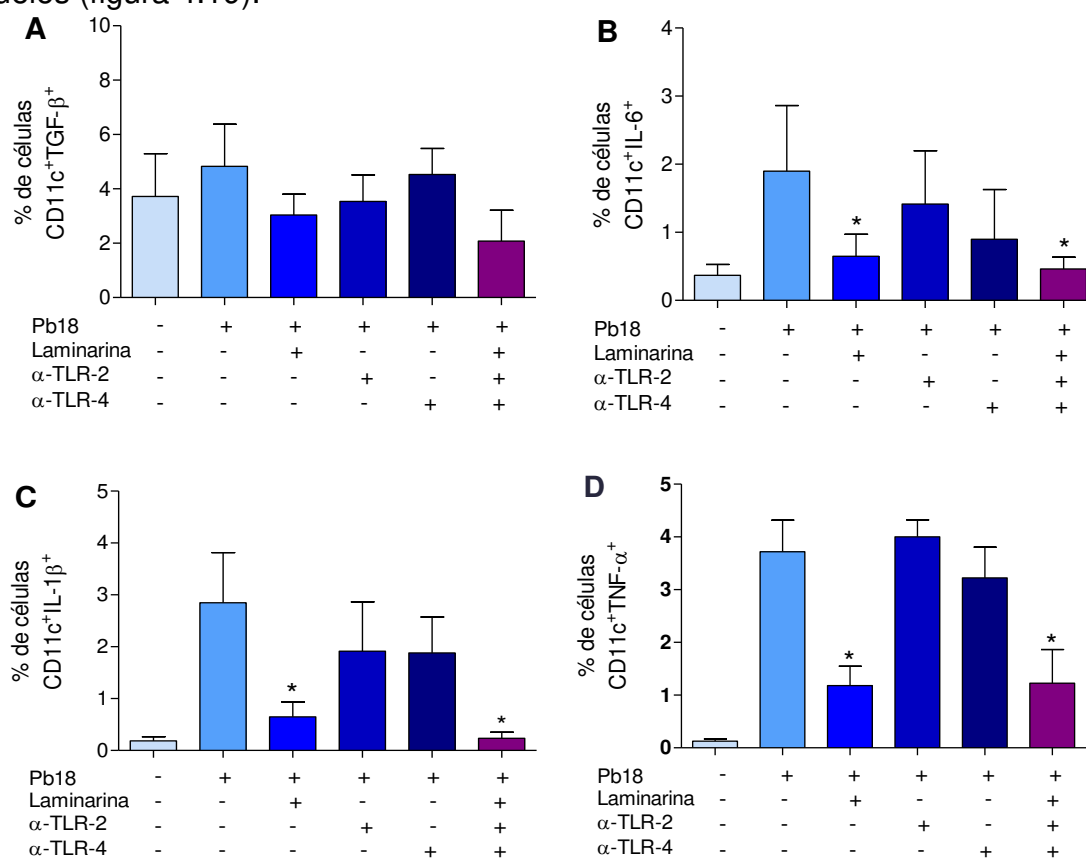


Figura 4.19: Avaliação da produção de TGF- β , IL-6, IL-1 β e TNF- α por DCs tratadas com bloqueadores de TLR-2, TLR4 ou Dectina-1 e incubadas com Pb18: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células dendríticas (CD11c) positivas para TGF- β (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D). DCs derivadas de monócitos foram primeiramente incubadas com bloqueadores específicos de Dectina-1 (Laminarina) e/ou TLR2 e TLR4 (anticorpos bloqueadores) e depois mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 18 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 - razão 1:10). Número de amostras 6 (n=6). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de

Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

4.8. Efeito do bloqueio dos TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 na diferenciação de linfócitos TCD3⁺CD4⁺ e produção de citocinas.

Para verificar se o bloqueio do TLR-2, TLR-4 ou Dectina-1 poderia alterar a forma como as células dendríticas ativam e estimulam as células TCD3⁺CD4⁺, realizamos alguns experimentos nos quais as células dendríticas foram bloqueadas com anti-TLR-2, anti-TLR-4 ou Dectina-1, incubadas com leveduras das cepas Pb18 e cocultivadas com células TCD3⁺CD4⁺ autólogas. Após 5 dias de cultura as células foram coletadas e analisadas. Foi possível observar que a cepa Pb18 leva a diferenciação de células produtoras de IFN- γ . Ao que parece o TLR-4 e a Dectina-1 tem um papel pequeno para a geração dessas células pois o bloqueio dessas moléculas não interfere com o número de células produtoras de IFN- γ . Ao contrário, o bloqueio da sinalização via TLR-2 induziu redução da população de linfócitos produtores de IFN- γ (figura 4.20A). A população produtora de IL-17 também é induzida pela presença do Pb18 e é interessante observar que somente o bloqueio da Dectina-1 leva a redução da produção de IL-17 (figura 4.20B). De forma semelhante a IL-17 produção da IL-22 parece estar ligada a sinalização via Dectina-1 (figura 4.20E). Já a produção de IL-4 e IL-9 parecem ser reguladas negativamente pelos receptores TLR2, TLR4 e Dectina-1 já que, uma vez que esses são bloqueados, ocorre diferenciação de número maior de células produtoras de IL-4 e IL-9 (figura 4.20C e 4.20 D respectivamente).

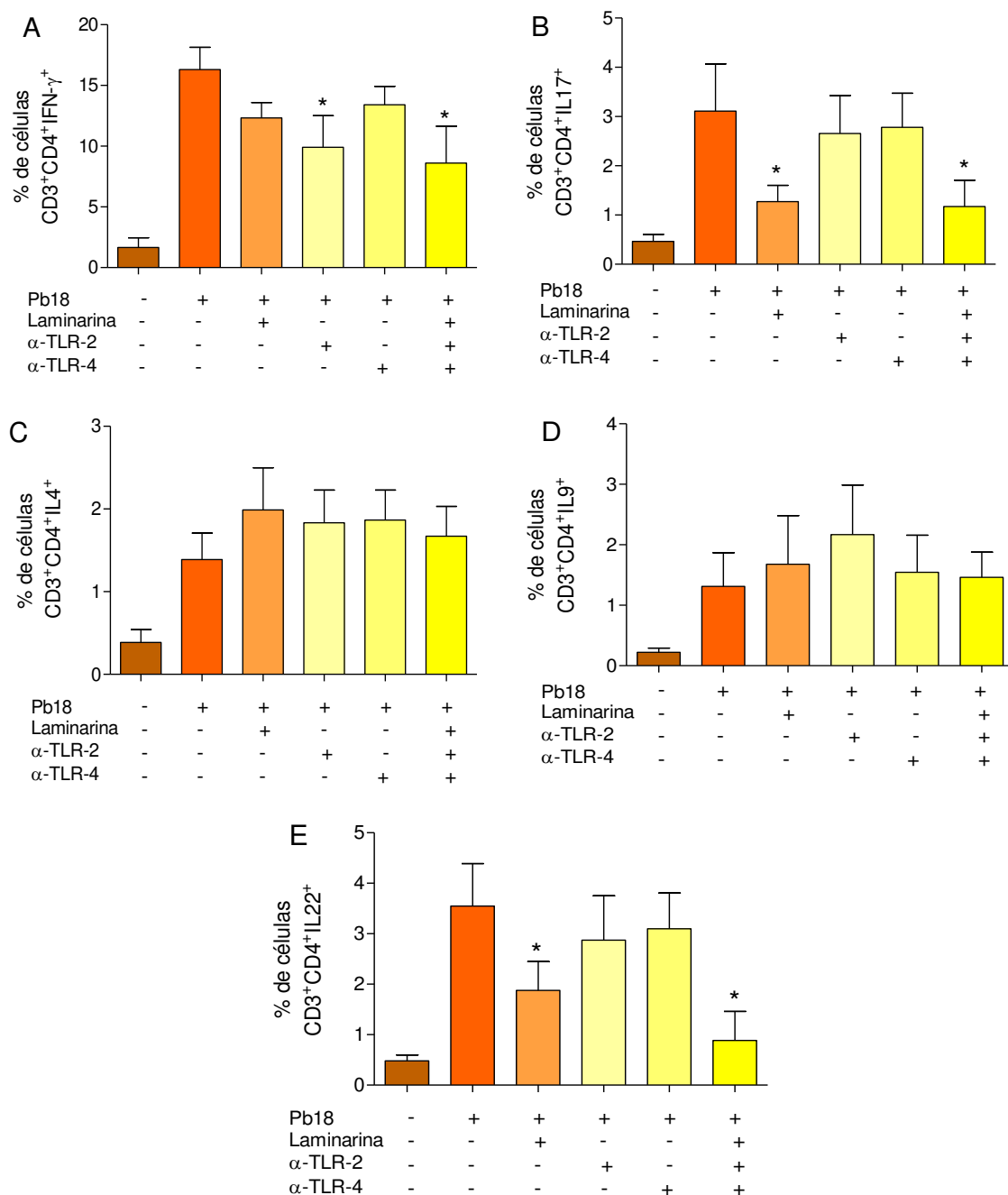


Figura 4.20: Avaliação das citocinas produzidas por linfócitos estimulados por DCs submetidas a diferentes bloqueios e incubadas com Pb18: Análise da frequência de populações de células TCD3⁺CD4⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-4 (C), IL-9 (D) e IL-22 (E) diferenciadas na presença de células dendríticas incubadas com anti-TLR-2, anti-TLR-4 ou Laminarina e estimuladas com Pb18. Número de amostras 12 (n=12). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Além de caracterizarmos a diferenciação dos linfócitos por citometria de fluxo, analisamos nos sobrenadantes de cultura (por ELISA) a produção das citocinas características das respostas Th1, Th2 e Th17. Conforme pode ser observado na figura abaixo (figura 4.21).

A produção de IFN- γ foi reduzida após o bloqueio da Dectina-1 e do TLR2 (isolados ou em combinação) (figura 4.21A). Em relação à produção de IL-17 observamos diminuição da produção somente quando bloqueamos a Dectina-1 (figura 4.21B). Já a produção de IL-22 não foi afetada por nenhum dos bloqueios utilizados (4.21C). Infelizmente não foi possível detectar a presença de IL-4 nas culturas através do ELISA.

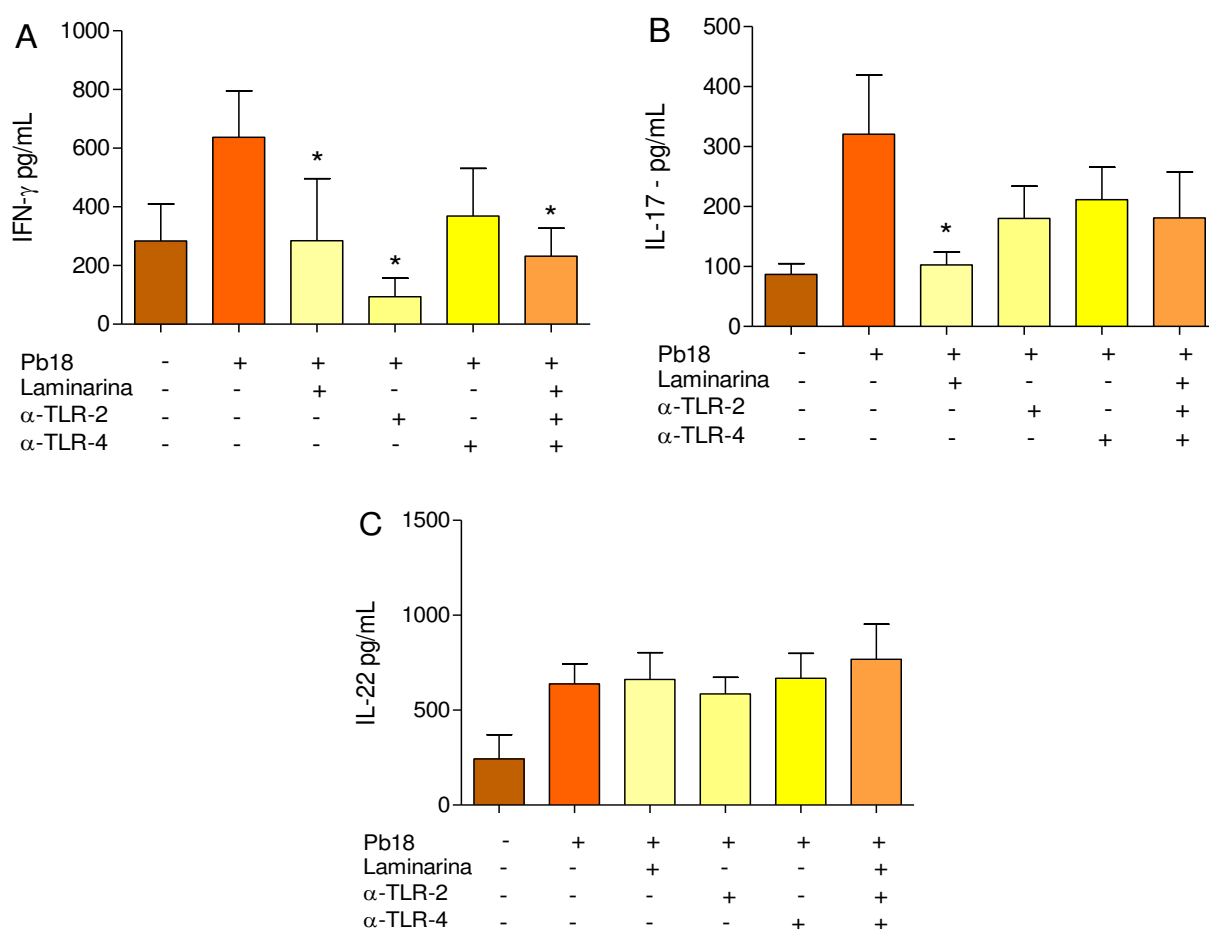


Figura 4.21 (página anterior): Quantificação da produção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 produzida por linfócitos estimulados por células dendríticas incubadas com Pb18 e bloqueadores de TLR2, TLR4 e Dectina-1. Dosagem através de ELISA da produção de IFN- γ (A), IL-17 (B) e IL-22 (C) diferenciadas na presença de células dendríticas incubadas com anti-TLR-2, anti-TLR-4 ou Laminarina e estimuladas com Pb18. Número de amostras 11 (n=11). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ em relação às células estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

4.9. Análise da expressão do RNAm para os fatores de transcrição e citocinas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ) e controles

Após a série de experimentos descritos acima, decidimos avaliar possíveis diferenças nos perfis de produção de citocinas em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com paracoccidioidomicose (FJ e FA) e indivíduos controle. Pudemos observar que células de pacientes com a FA apresentam maior expressão do RNAm para o fator de transcrição T-bet em comparação aos pacientes com a FJ e indivíduos controle, e maior expressão do RNAm para IFN- γ do que células de pacientes com a FJ (figuras 4.22A e 4.22B respectivamente). Em relação aos marcadores da resposta Th2, pudemos observar que as células dos pacientes com a FJ da PCM, apresentam maior expressão do fator de transcrição GATA-3 em comparação aos indivíduos controle e pacientes com a FA, enquanto a expressão do RNAm para IL-4 foi estatisticamente maior em relação aos indivíduos controle (figuras 4.22C e 4.22D respectivamente). Já em relação aos parâmetros relacionadas à resposta Th17 (Rorc e IL-17), observamos que células de pacientes com a FA apresentaram uma maior expressão em relação aos outros grupos analisados (figura 4.22E e 4.22F).

Também analisamos a expressão do RNAm do fator de transcrição necessário para a produção de IL-22 (Ahr) e observamos uma maior expressão em células dos dois grupos de pacientes em comparação ao grupo controle (figura 4.22G), entretanto não observamos diferenças estatísticas na expressão do RNAm para IL-22 (figura 4.22H). Para a produção de IL-9 é necessária a participação do fator de transcrição PU.1, a análise dos nossos resultados demonstrou que as células de pacientes de ambas as formas clínicas da PCM apresentaram uma maior expressão desse gene (figura 4.22I), embora não haja diferença na expressão do RNAm para IL-9 (figura 4.22J). Em relação ao fator de transcrição Foxp3 (característico de células regulatórias), observamos expressão aumentada e similar nas duas formas da doença, em comparação aos indivíduos controle (figura 4.22K). Em relação ao RNAm para as citocinas supressoras IL-10 e TGF- β , pudemos observar que o RNAm para IL-10 é mais expresso por células de pacientes (notadamente de pacientes com a FJ - figura 4.22L), o mesmo ocorrendo com o RNAm para TGF- β (figura 4.22M).

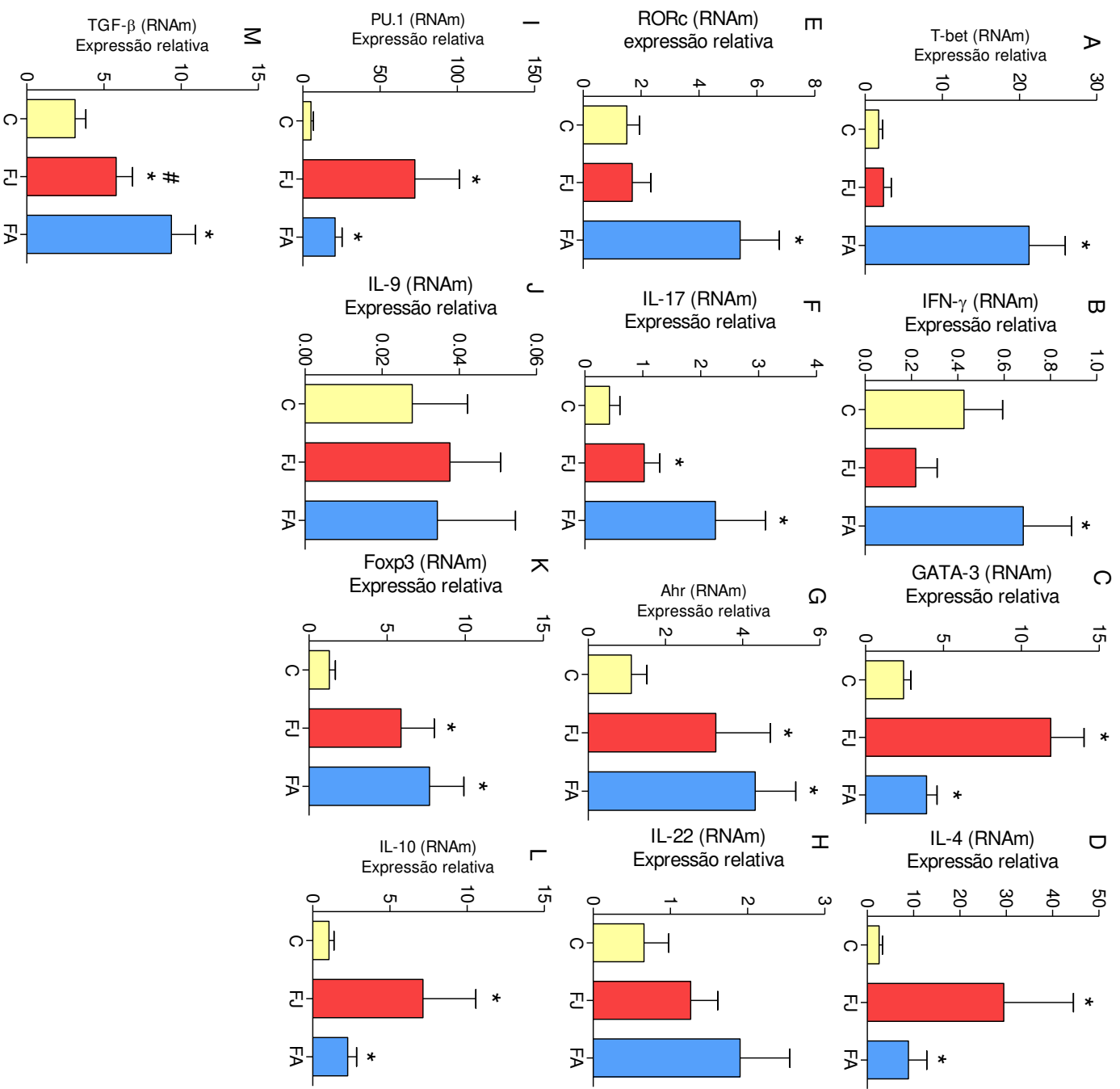


Figura 4.22 (página anterior): Quantificação da expressão de citocinas associadas as respostas Th1, Th2, Th9 e Th17 em CMSP de pacientes com PCM (FA e FJ) e controles. (página anterior): Quantificação relativa da expressão do RNAm para Tbet (A), IFN- γ (B), GATA-3 (C), IL-4 (D), Rorc (E), IL-17 (F), Ahr (G), IL-22 (H), PU.1 (I), IL-9 (J), Foxp3 (K), IL-10 (L) e TGF- β (M) por células mononucleares do sangue periférico não estimuladas de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (forma adulta – FA - n=10 e forma juvenil - FJ - n=10) e controles (C - n=10). Número de amostras 11 (n=11). Resultados expressos como média $\pm$ SEM. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo controle (C); # $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo FA.

4.10. Análise da presença de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ produtores de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose.

Após a realização dos experimentos descritos acima, decidimos analisar se havia diferenças nos fenótipos de produção de citocinas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com paracoccidiodomicose e indivíduos controle. Para isso, após a separação as CMSP foram estimuladas *in vitro* com beads recobertas com anticorpos anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD2 por 3 dias. Após esse período as células foram mantidas sem estímulo adicional ou reestimuladas com PMA + Ionóforo de cálcio por 6 horas. As culturas foram suplementadas com brefeldina A nas 6 últimas horas de cultura.

Os resultados demonstraram que CMSP de pacientes com a FA da PCM apresentam uma maior porcentagem de células produtoras de IFN- γ (figura 4.23A) e de IL-17 (figura 4.23B) quando comparadas aos demais grupos analisados (FJ e controles). Por outro lado, células de pacientes com a FJ da PCM, apresentam um número maior de células positivas para IL-4 (figura 4.23C). Também observamos que a porcentagem de células produtoras de IL-9 foi aumentada nos dois grupos de pacientes com paracoccidiodomicose, quando comparado aos indivíduos

controle (figura 4.23D). Em relação à produção de IL-22, observamos uma maior frequência de células produtoras dessa citocina no grupo de pacientes com a FA da doença (figura 4.23E).

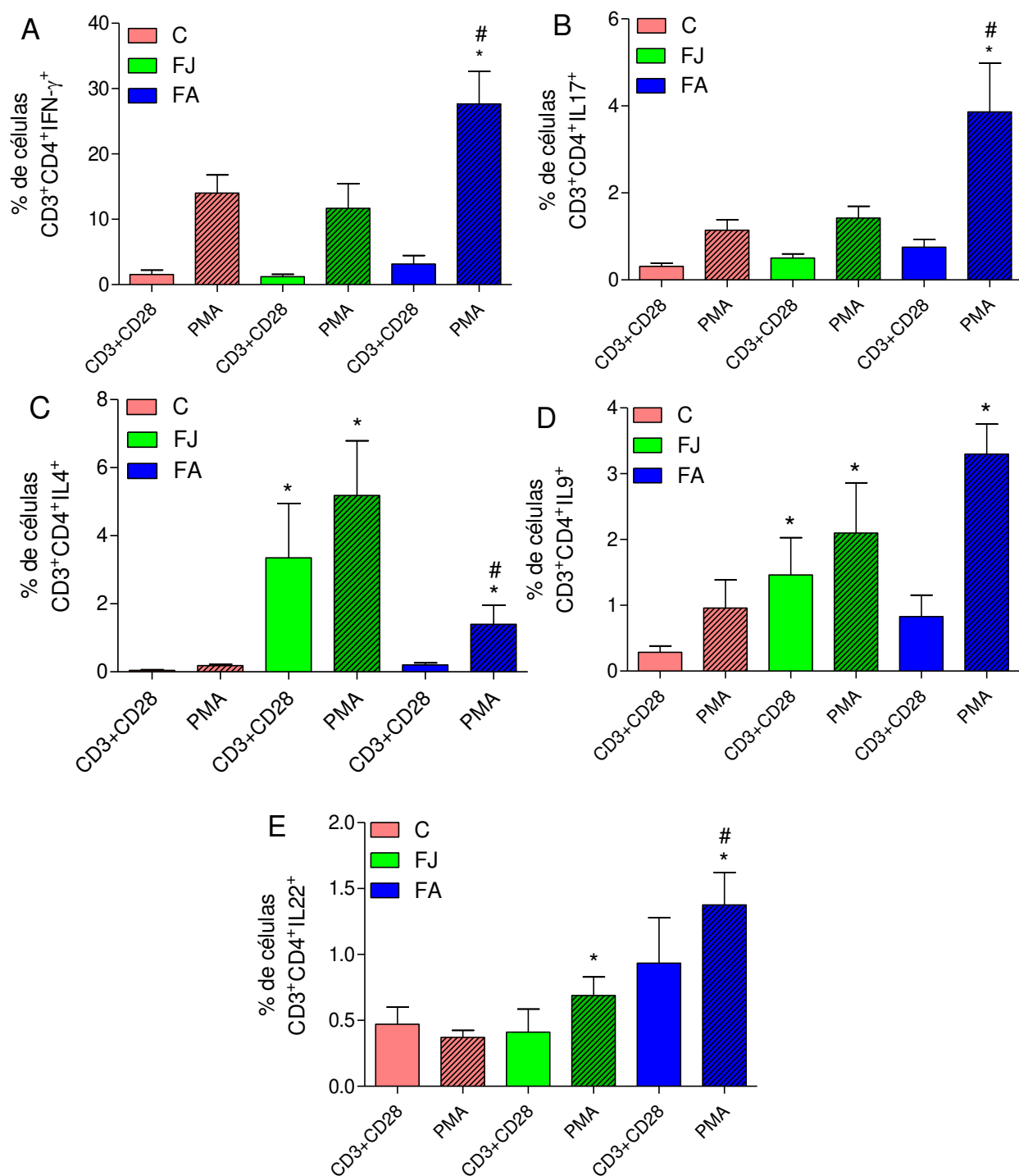


Figura 4.23 (página anterior): Produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-9 e IL-22 por CMSPs de pacientes com PCM (FA e FJ) e controles: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (A), CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ (B), CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ (C), CD3⁺CD4⁺IL-9⁺ (D) e CD3⁺CD4⁺IL-22⁺ (E) de indivíduos com a FA ou a FJ da PCM ou indivíduos do grupo controle. As CMSP foram estimuladas por 3 dias com "beads" recobertas com anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD2 (CD3+CD28) e após esse período reestimuladas com PMA + ionóforo de cálcio (50ng/mL e 250ng/mL - PMA). Número de amostras 10 (n=10). Resultados expressos como média $\pm$ SEM. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo controle (C); # $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo FJ.

Além de observarmos o desenvolvimento de populações positivas apenas para uma citocina, pudemos observar a presença de células produtoras de mais de uma citocina (ver dot-plots representativos da análise na figura 4.24).

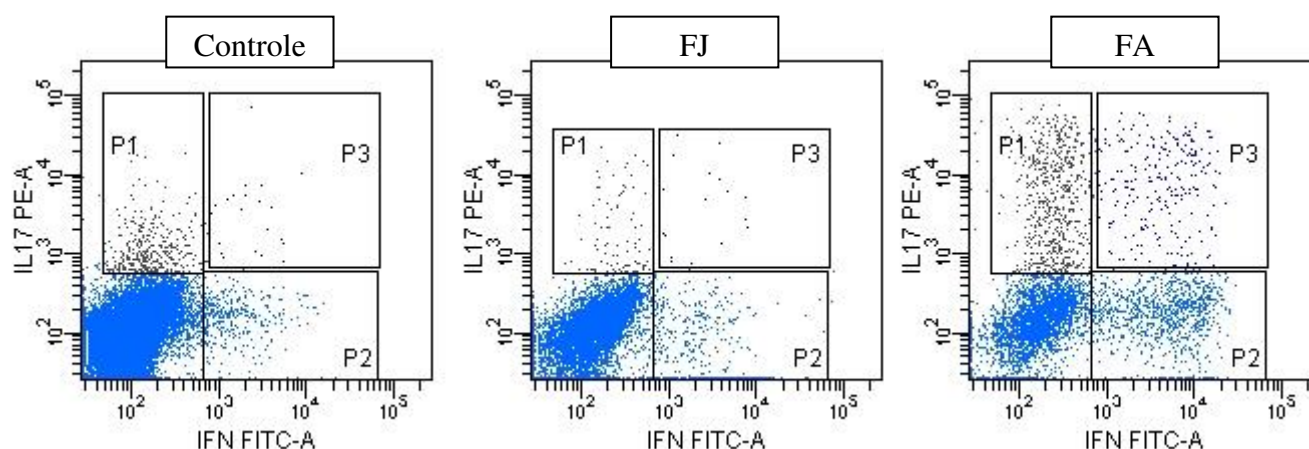


Figura 4.24: Representação das populações duplo positivas para IFN- γ e IL-17 em controles, indivíduos com a forma juvenil e com a forma adulta da doença. "Dot-plots" representativos da análise por citometria de fluxo da produção de IFN- γ e IL17 por linfócitos T CD3⁺CD4⁺ cultivados por 3 dias com "beads" recobertas com anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD2 (SE) e após esse período reestimuladas com PMA + ionóforo de cálcio (50ng/mL e 250ng/mL). A análise foi realizada com "gates" na região de linfócitos, em células CD3⁺CD4⁺. Pode-se observar que os estímulos levam a diferenciação de linfócitos produtores de apenas IL17 (P1), de apenas IFN- γ (P2) ou duplo positivos (P3).

Observamos um percentual significativamente maior de células duplamente marcadas para IFN- γ e IL-17 em pacientes com a forma adulta da doença em

comparação aos indivíduos controle ou pacientes com a forma juvenil (figura 4.25A). Além disso, observamos também número aumentado de células IL-17⁺IL-22⁺ e maior frequência de células produtoras das três citocinas IFN- γ ⁺IL-17⁺IL-22⁺ em pacientes com a forma adulta da doença em comparação aos outros grupos analisados (figura 4.25B e 4.25C respectivamente).

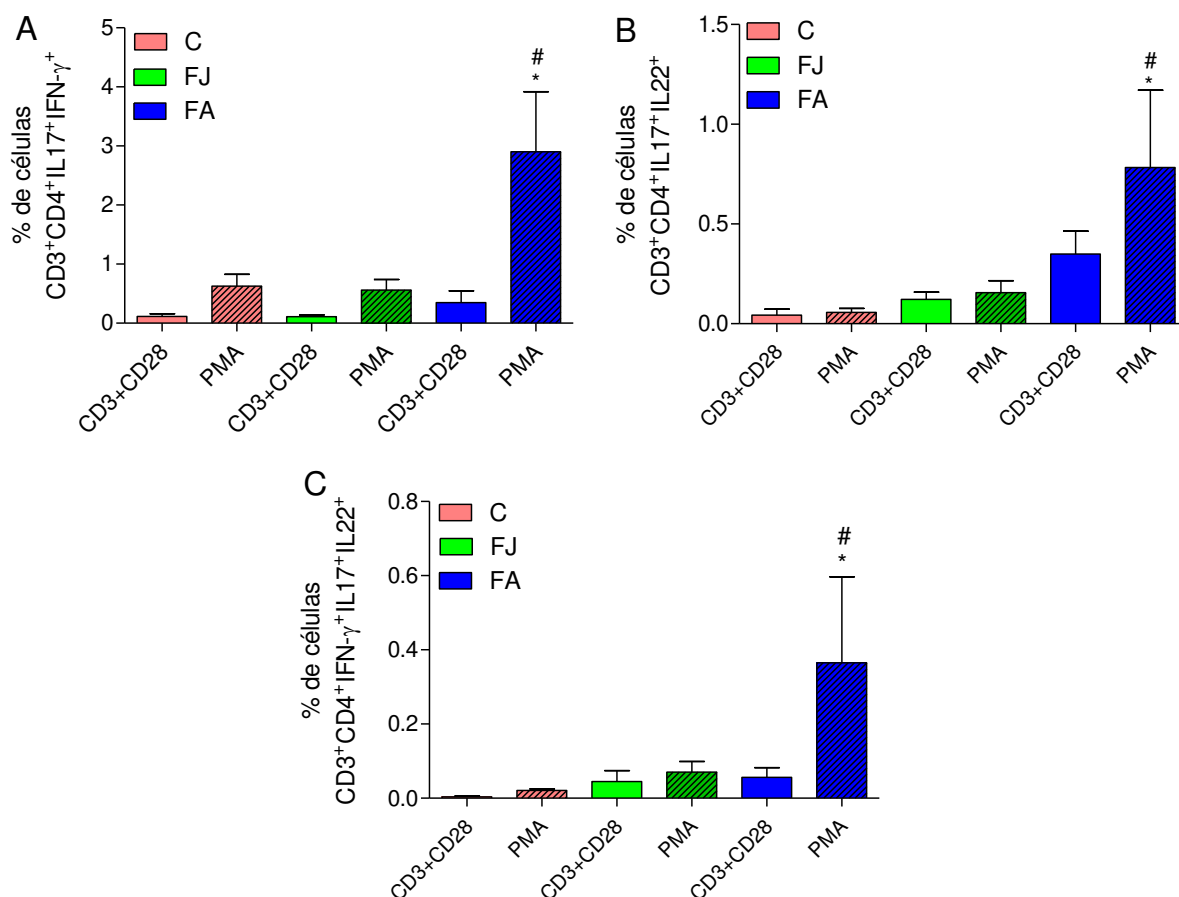


Figura 4.25: Análise de populações duplo ou triplo positivas para IFN- γ , IL-17 e IL-22: Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ (A), CD3⁺CD4⁺IL17⁺IL22⁺ (B) e CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺IL17⁺IL22⁺ (C) de indivíduos com a FA ou a FJ da PCM ou indivíduos do grupo controle. As células foram estimuladas por 3 dias com "beads" recobertas com anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD2 (CD3+CD28) e após esse período reestimuladas com PMA + ionóforo de cálcio (50ng/mL e 250ng/mL - PMA). Número de amostras 10 (n=10). Resultados expressos como média $\pm$ SEM. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo controle (C) submetido ao mesmo estímulo; # $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo FJ submetido ao mesmo estímulo.

Além da análise por citometria de fluxo, também avaliamos a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de CMSPs. Foram realizados os testes de ELISA para a quantificação da produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-22, IL-9 e IL-4. Não foi possível detectar produção de IL-4 nas amostras. Note que no ELISA os resultados da estimulação das células somente com as "beads" foi muitas vezes igual ao observado após o estímulo adicional com PMA, fato não observado na citometria de fluxo, isto provavelmente é devido ao acúmulo das citocinas nos sobrenadantes de cultura ao longo do período de estimulação (resultado que não pode ser observado pela citometria de fluxo).

Os resultados demonstraram que há uma grande produção de IFN- γ nas culturas de células dos controles ou pacientes com a forma adulta da doença tanto estimulados com PMA assim como nas amostras estimuladas somente com as beads, enquanto que as células de pacientes com a forma juvenil apresentaram baixa produção de IFN- γ (figura 4.26A). Observamos também intensa produção de IL-17 por pacientes com a forma adulta da doença, contrastando com a baixa produção de IL-17 nos pacientes com a forma juvenil (figura 4.26B). A IL-22 também apresentou-se bastante aumentada em pacientes com a paracoccidioidomicose crônica em comparação aos controles ou pacientes com a forma juvenil (figura 4.26C). A IL-9 parece ser produzida nas duas forma clínicas da doença com uma tendência maior nos pacientes juvenis (figura 4.26D).

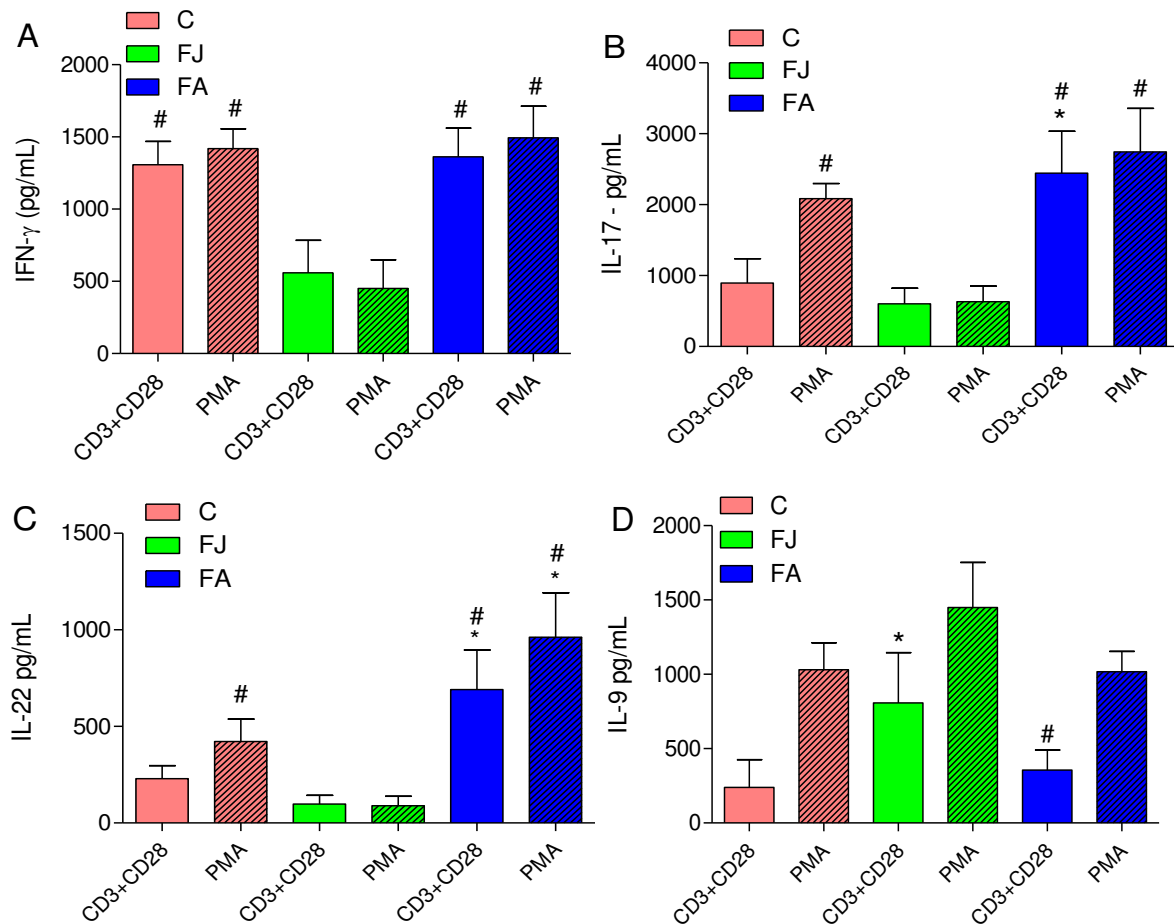


Figura 4.26: Análise das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-22 e IL-9 produzidas nas culturas de CMSPs de pacientes com a forma juvenil ou adulta da PCM e indivíduos saudáveis: Dosagem por ELISA da produção de IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-22 (C) e IL-9 (D) produzidas por CMSPs de indivíduos saudáveis (Controles), pacientes com a forma juvenil (FJ) e pacientes com a forma adulta (FA) da PCM. As células foram estimuladas por 3 dias com "beads" recobertas com anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD2 (CD3+CD28) e após esse período reestimuladas com PMA + ionóforo de cálcio (50ng/mL e 250ng/mL - PMA). Após esse período foi coletado o sobrenadante de cultura para a realização da técnica de ELISA. Número de amostras 9 (n=9). Análise estatística: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. * $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo controle (C) submetido ao mesmo estímulo; # $p \leq 0,05$ - em relação ao grupo FJ submetido ao mesmo estímulo.

4.11. Análise *in situ* de citocinas produzidas em lesões de pacientes com PCM

Também realizamos algumas reações de imunoistoquímica para verificar a produção de citocinas produzidas por linfócitos T e características das diferentes populações de linfócitos, em lesões de pacientes com PCM. A marcação para IFN- γ , citocina chave da resposta Th1, foi mais intensa nas mucosas do que nos linfonodos (figura 4.27), em áreas onde o processo inflamatório era mais exuberante (figura 4.27). Nos linfonodos, células IFN- γ^+ foram raramente detectadas e, quando presentes, localizavam-se, geralmente em áreas próximas aos granulomas (figura 4.27A). A marcação para IFN- γ ocorreu principalmente em células com característica de linfócitos (figura 4.27A e B).

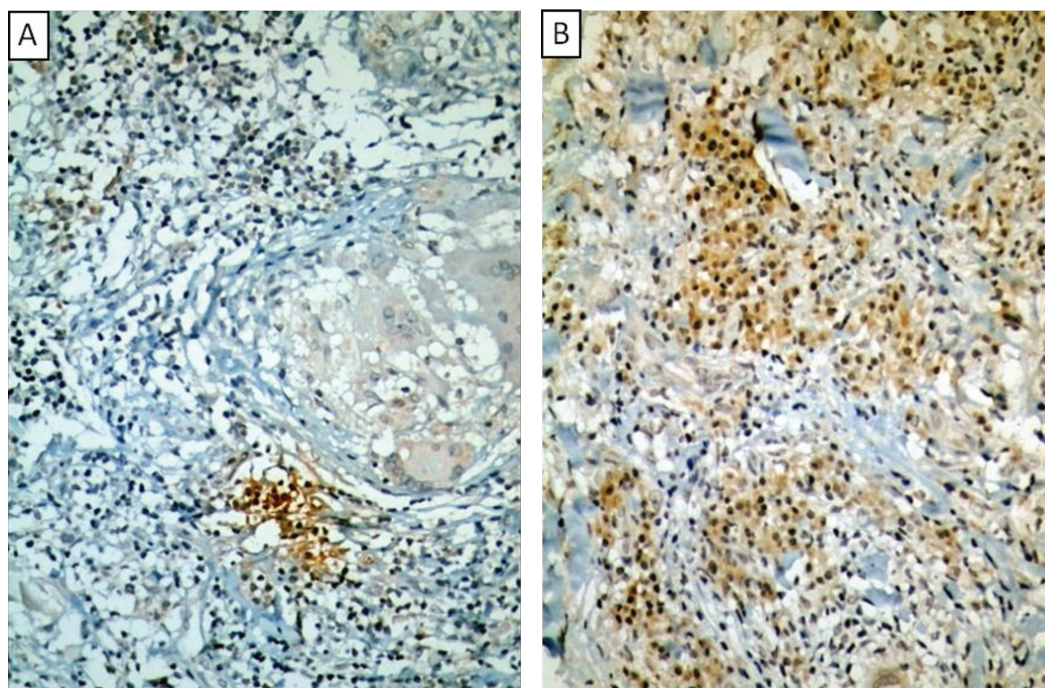


Figura 4.27: Análise da produção de IFN- γ em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica - Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-IFN- γ (células marcadas em marrom). Aumento 400X.

Em relação à expressão de IL-4, característica da resposta Th2, observamos que nas lesões de pacientes com a FJ (linfonodos) a marcação foi mais intensa (figura 4.28A) quando comparada as lesões de mucosa oral (figura 4.28B), que raramente apresentaram células positivas para esta citocina.

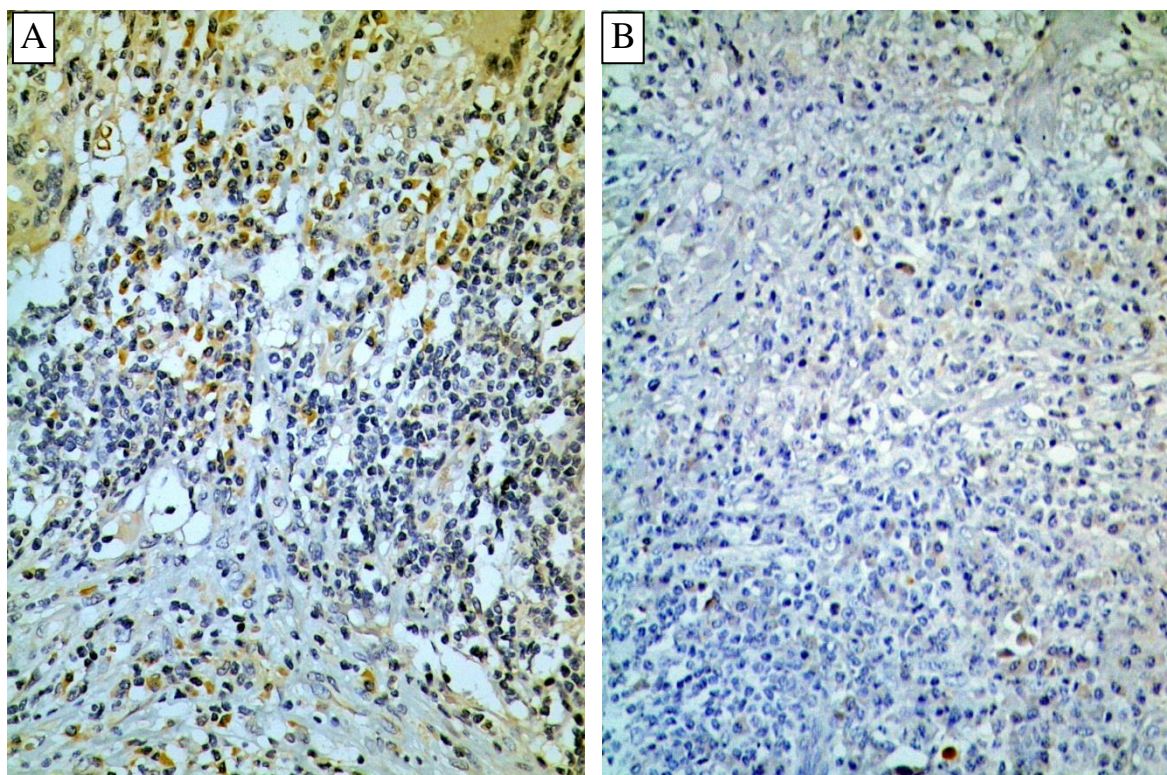


Figura 4.28: Análise da produção de IL-4 em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica: Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-IL-4 (células marcadas em marrom). Aumento 400X.

A marcação para IL-17 foi mais intensa nas lesões de mucosa oral, tanto em células do infiltrado inflamatório como em células epiteliais (figura 4.29B). Em alguns casos células gigantes também foram positivas. Nos linfonodos a marcação foi menor, ficando restrita às células gigantes e alguns linfócitos de permeio (figura 4.29A).

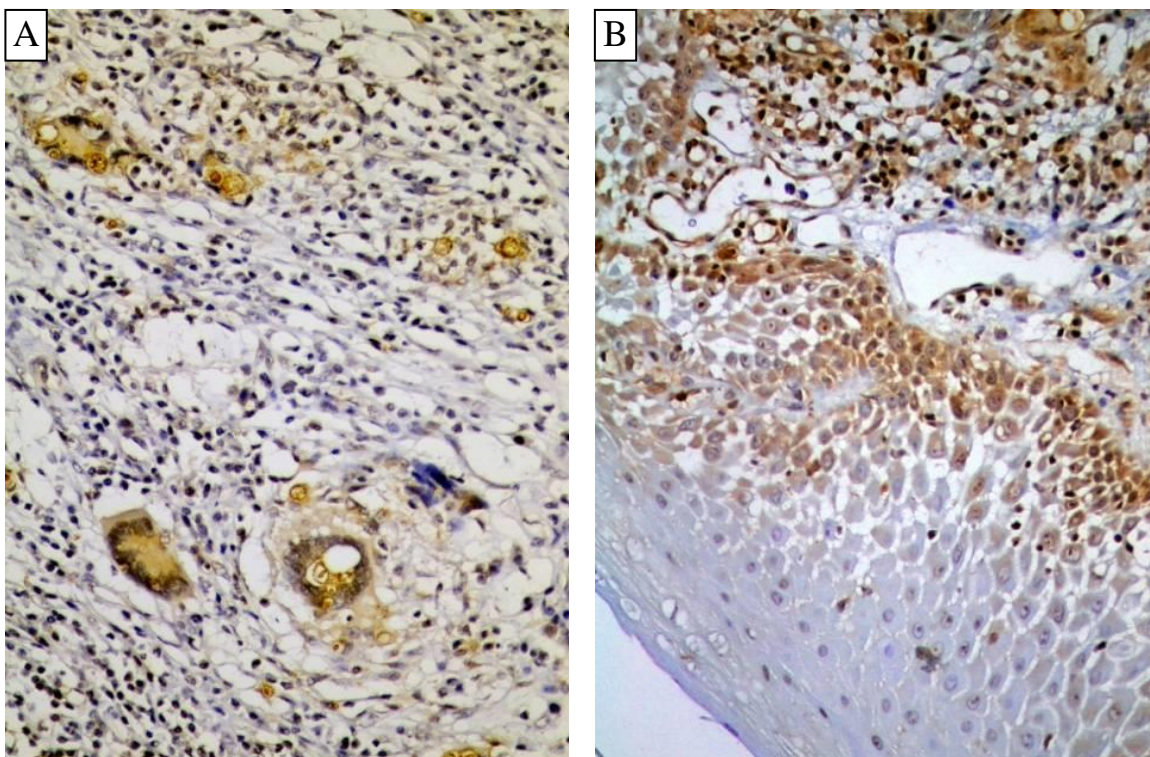


Figura 4.29: Análise da produção de IL-17 em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica: - Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-IL-17 (células marcadas em marrom). Aumento 400X.

A IL-22, citocina importante para a reposta Th17 mostrou-se bastante expressa nos linfonodos (figura 4.30A) dos pacientes principalmente em células com morfologia de linfócitos, no entanto, a marcação foi mais intensa nas mucosas, nas quais encontramos a citocina tanto em linfócitos como em células gigantes (figura 4.30B).

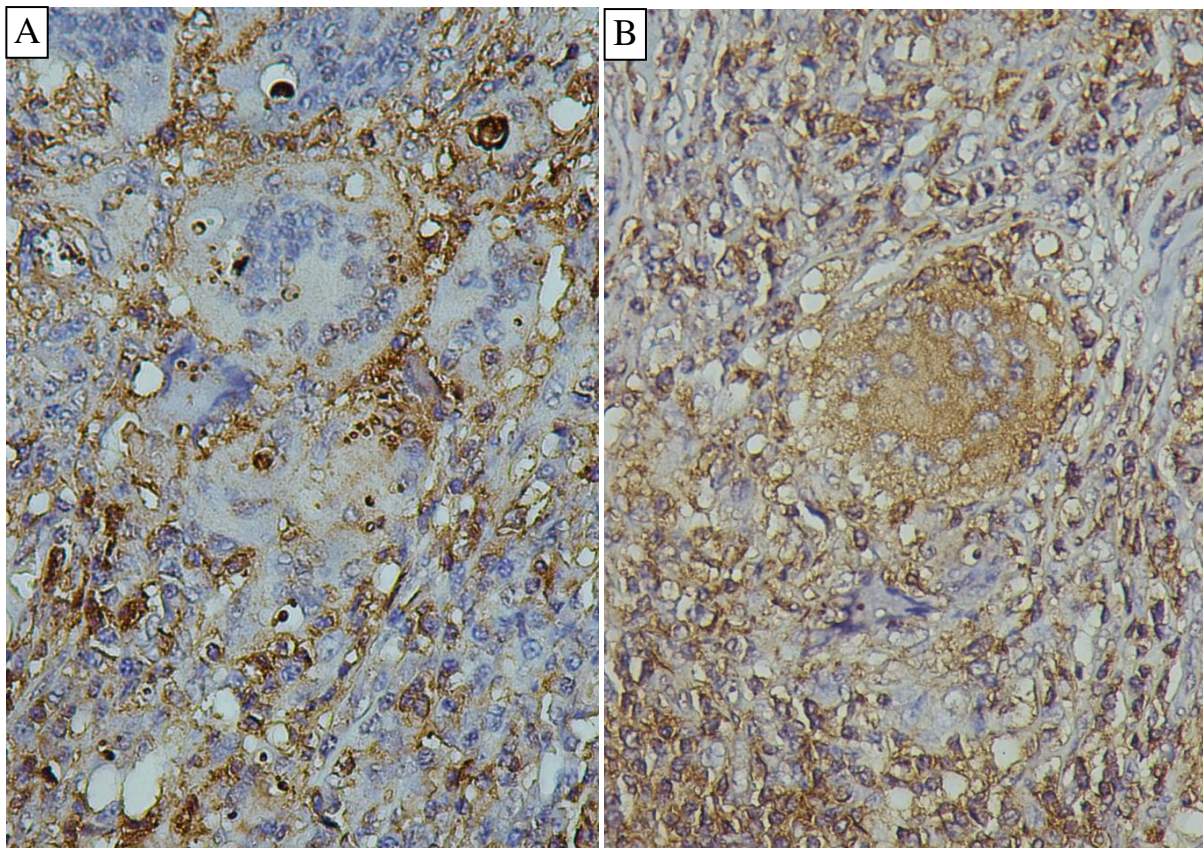
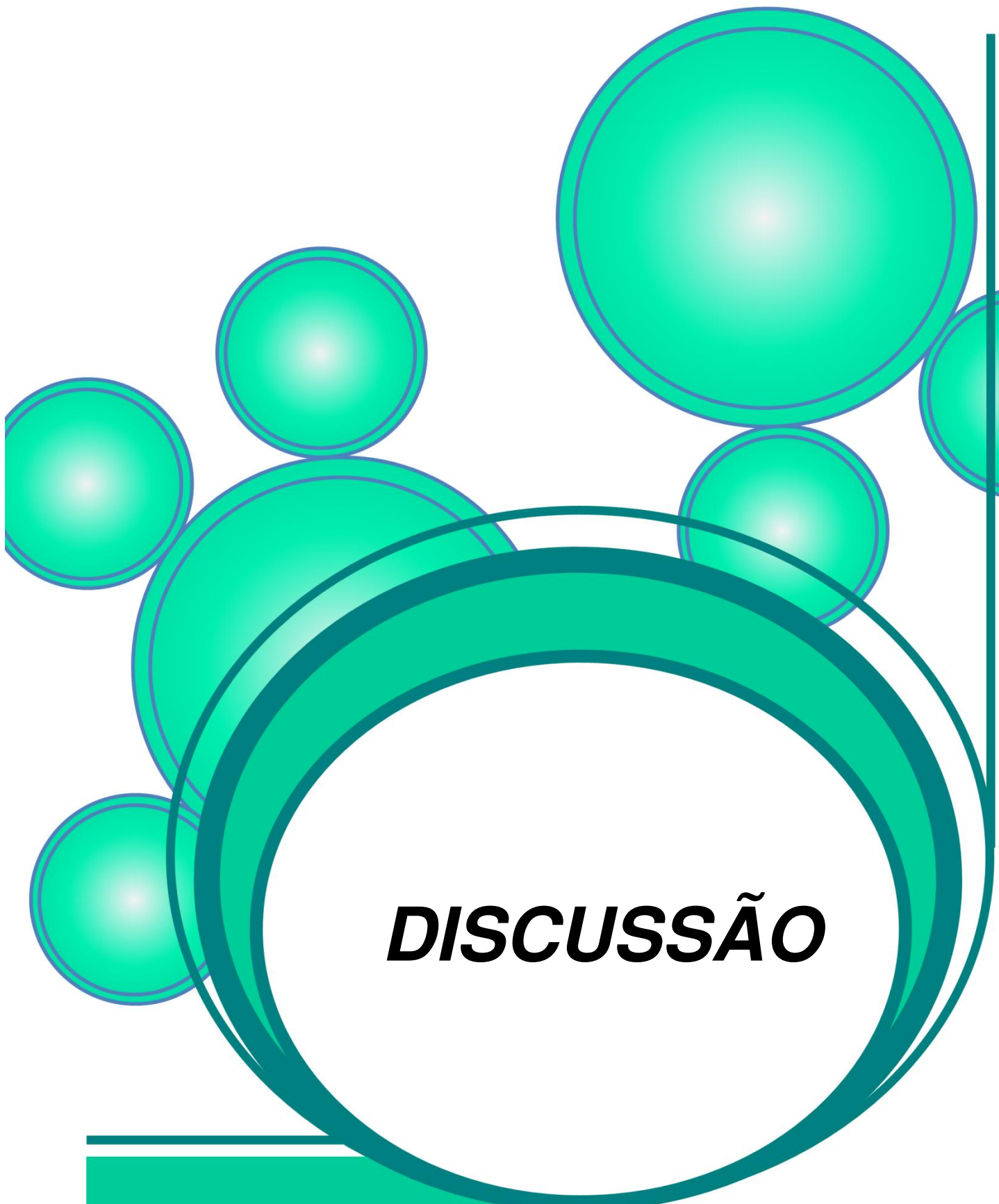


Figura 4.30: Análise da produção de IL-22 em lesões e linfonodos de pacientes com PCM através de imunoistoquímica: Cortes histológicos de linfonodo (**A**) e mucosa oral (**B**) de pacientes com PCM marcados com anti-IL-22 (células marcadas em marrom). Aumento 400X.

An abstract graphic featuring several teal circles of varying sizes, some with a gradient and a dark teal outline. A large, thick, dark teal ring is positioned in the lower half of the page, framing the word 'DISCUSSÃO'. A vertical teal line is on the right side, and a horizontal teal bar is at the bottom left.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos em nosso trabalho demonstraram que células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico se diferenciam em DCs fenotipicamente maduras (mDC) e funcionais na presença de leveduras do fungo *P. brasiliensis*, quando comparado com DCs que não receberam estímulo com as leveduras. Estas células passaram a expressar fenótipo característico de mDCs com aumento da expressão do CD83, CD80, CD86 e das moléculas de MHC de classe II.

A maturação das DCs representa uma importante etapa para que as células sejam capazes de exercer sua função de APC. O CD83 foi descrito na literatura com um marcador específico de DCs humanas fenotipicamente competentes em conjunto com as moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86), e moléculas de MHC de classe I e MHC de classe 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 [115-118].

Nossos resultados também revelaram que DCs estimuladas com as leveduras do fungo apresentaram uma diminuição da expressão tanto de CD1a como de CD209. 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 linfócitos T e que o microambiente modula a sua expressão em mDCs CD11c⁺, induzindo a geração de DCs CD1a⁺ e CD1a⁻ [119]. 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, sendo capaz de controlar muitas das funções destas células durante a resposta imune. Atuando como um receptor de fagocitose o CD209 pode facilitar a internalização de alguns antígenos solúveis que são processados e apresentados aos linfócitos T. O CD209 também está envolvido na endocitose de fungos como leveduras de *Candida albicans* e conídios de *Aspergillus fumigatus* e *Chrysosporium tropicum* [120].

As células leveduriformes de *P. brasiliensis* também induzem o aumento da expressão das moléculas de MHC de classe II, assim como de CCR7. O CCR7 é um receptor de quimiocina expresso na superfície de DCs, que 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* [121].

Posteriormente foi avaliada a expressão do RNAm para citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em DCs 18 horas após o estímulo com as leveduras do fungo. Os resultados revelaram que a estimulação das DCs com as leveduras do fungo induziu o aumento da expressão do RNAm para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p35 e IL-23p19, citocinas importantes para a diferenciação de células Th1 e Th17.

As células Th17 se diferenciam a partir de células T *naive* somente em condições específicas, da mesma maneira que linfócitos Th1 e Th2. A diferenciação de células T nas diversas subpopulações é regulada principalmente pela presença de certas citocinas produzidas no ambiente onde ocorre a apresentação do antígeno, a interação dessas citocinas com seus receptores leva

a sinalização intracelular específica, e posterior ativação de fatores de transcrição que são característicos de cada uma dessas subpopulações [56]. De maneira geral as células Th17 se diferenciam na presença de TGF- β e IL-6, sendo que outras citocinas inflamatórias como IL-1 β (principalmente nos seres humanos) e TNF- α podem ter efeitos adicionais [92, 122-126]. A presença de IL-23 e IL-2 também parecem influenciar a diferenciação e sobrevivência das células Th17 [122]. Nossos dados demonstraram que DCs estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* aumentam a expressão do RNAm para todas essas citocinas, indicando um potencial para a produção das mesmas e consequentemente para a indução de uma resposta Th17 pelos linfócitos T. Os resultados obtidos pela análise da expressão gênica foi corroborado pelos experimentos com citometria de fluxo, nos quais pudemos observar que células dendríticas estimuladas com as células leveduriformes são capazes de produzir citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos Th17.

Na infecção experimental por *C. albicans* aparentemente há diferenças importantes no reconhecimento das células fúngicas pelas células dendríticas, enquanto as hifas induzem a produção de IL-23, o mesmo não ocorre com a forma de levedura, que por sua vez induz a produção de IL-12 [59]. Essa resposta diferencial frente às duas formas de *C. albicans*, provavelmente se deve ao reconhecimento desses patógenos por receptores específicos em células apresentadoras de antígeno (TLRs ou Dectina-1) [31]. LeibundGut-Landmann *et al.* (2007) demonstraram que células dendríticas estimuladas com ligante específico de Dectina-1 (Curdlan) são capazes de promover a diferenciação de

células T “naive” em células Th17. Por outro lado, Acosta-Rodriguez *et al.* (2007) demonstraram que células dendríticas estimuladas com LPS (ligante de TLR4) são pouco eficientes para a diferenciação de linfócitos Th17 [59].

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 *C. albicans* e *Pneumocystis jiroveci* [87]. As moléculas de TLR2 e TLR4 também estão envolvidas no reconhecimento de *C. albicans*, induzindo a produção de citocinas inflamatórias [127]. Recentemente demonstramos a participação do TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 no reconhecimento e internalização do *P. brasiliensis* por monócitos e neutrófilos humanos e ativação da resposta imunológica ao fungo [85]. 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 [90]. Este reconhecimento é fundamental para a imunidade anti-fúngica. Além do reconhecimento das β -(1,3) glucanas, outros trabalhos mostraram que, em humanos, a Dectina-1 pode funcionar como uma molécula coestimulatória para células T [90]. Diferente dos TLRs que induzem uma resposta Th1, a Dectina-1 induz a produção de IL-23 e IL-6 polarizando a resposta imune adaptativa para células Th17 [76]. 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. Nossos resultados demonstraram que a maior produção de IL-23 pelas DCs

ocorreu após o estímulo com Curdlan (agonista de Dectina-1) e que o estímulo com as leveduras de *P. brasiliensis* também estimulam a produção de IL-23.

Os experimentos com coculturas de DCs e linfócitos também corroboram esses achados. Um dos resultados mais interessantes foi o de que o estímulo de DCs com células leveduriformes de *P. brasiliensis* levou a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ produtores de grandes quantidades de IL-17 e quantidades menores de IL-22, de maneira bastante similar àquela observada em relação ao estímulo com Curdlan (agonista específico para Dectina-1). Essa produção ocorreu em detrimento da produção de IFN- γ . De modo diverso, o estímulo com agonistas específicos para TLR4 (LPS) e TLR2 (Pam3CSK4) levou a diferenciação de células produtoras de IFN- γ e de IFN- γ e IL-4, respectivamente. Esses resultados são fortes indícios de que o reconhecimento das células leveduriformes de *P. brasiliensis* pelas DCs se dá por meio da Dectina-1, em conjunto com o TLR2 e TLR4. Outro fator que pode corroborar essa hipótese, é a diminuição desses receptores na superfície de DCs estimuladas com o fungo, o que poderia ocorrer em função da internalização do receptor. Por outro lado, Acosta-Rodriguez *et al.* (2007) demonstraram que células dendríticas estimuladas com LPS (ligante de TLR4) são pouco eficientes para a diferenciação de linfócitos Th17 [59]. Os TLRs de maneira geral (com exceção do TLR3) sinalizam via uma molécula adaptadora em comum (MyD88 – sendo que o TLR2 utiliza a molécula adaptadora MAL), enquanto que a Dectina-1 sinaliza via Syk e Card-9, e essa ativação diferencial aparentemente leva a produção diferencial de citocinas. Resultados obtidos em modelo experimental demonstraram que a sinalização via

MyD88 é importante para o desenvolvimento de populações Th1, Th2 e Th17 e para o influxo de células inflamatórias para o pulmão durante a infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis* [128]. Nossos experimentos demonstraram que as células dendríticas aparentemente são capazes de reconhecer as células leveduriformes de *P. brasiliensis* por diferentes receptores uma vez que o estímulo com as leveduras levou à fosforilação de proteínas envolvidas tanto na sinalização por meio dos TLRs como pela Dectina-1. Em especial ficou claro que a presença das células leveduriformes de *P. brasiliensis* (assim como o agonista de Dectina-1) leva a fosforilação de Syk e Akt, um sinal claro do envolvimento da Dectina-1 no reconhecimento do fungo. Também pudemos notar que o estímulo com o Curdlan é o que apresentou o resultados mais similares ao estímulo com as leveduras de *P. brasiliensis*, tanto na indução de citocinas pelas células dendríticas como nas coculturas de linfócitos e DCs.

Os experimentos realizados com culturas de células dendríticas estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* também mostraram que quando cocultivadas com linfócitos CD4⁺ as DCs levam a geração de duas populações produtoras de IL-17 distintas: uma produtora somente de IL-17 e outra duplo-positiva para IL-17 e IL-22. Esse perfil foi observado também nas células estimuladas com o agonista da Dectina-1 mas não com LPS ou Pam3CSK4 sugerindo que a diferenciação dessa população possa ser ao menos em parte dependente da interação via Dectina-1. Resultados similares foram encontrados por Cheng *et al.* [129] que demonstraram que a geração de células Th17 na candidíase é dependente da via Dectina-1/inflamassoma.

Dillon *et al.* (2010) [130] observaram que a ligação do TLR-2 induz células dendríticas a produzirem IL-10 de forma abundante mas pouca IL-12 inibindo a diferenciação de células Th1 e promovendo células Th2. Contrariamente, quando as mesmas células dendríticas imaturas são estimuladas com ligantes para TLR-4 ocorre maior produção de IL-12 e diferenciação de células TCD4⁺ de perfil Th1. Desta forma, fica claro que o reconhecimento inicial através de diferentes TLRs pode influenciar e direcionar a resposta imune adaptativa. Nossos resultados também comprovam esses achados, uma vez que o estímulo com LPS levou a uma grande indução de linfócitos produtores de IFN- γ , por outro lado o estímulo com Pam3CSK4 foi o que mais induziu a produção de IL-4, em paralelo com o estímulo com as células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Também observamos que o estímulo de células dendríticas com o agonista de TLR2 e com leveduras de *P. brasiliensis* induziu a diferenciação de uma grande quantidade de linfócitos com fenótipo de células regulatórias (CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺). Sutmuller *et al.* (2006) demonstraram que o receptor do tipo Toll-2 (TLR-2) apresenta um papel de grande importância na indução de expansão e no controle das funções de células T regulatórias [131]. Na infecção experimental por *C. albicans*, foi demonstrado que a ausência do TLR-2 (nocaute) induz resistência à infecção pelo fungo, e que essa resistência pode ser associada à diminuição do número de células T regulatórias naturais e consequentemente da produção de IL-10 [132]. Nosso grupo, recentemente demonstrou que pacientes com PCM ativa apresentam uma maior quantidade de células regulatórias na circulação periférica e que essas células regulatórias apresentam maior atividade supressora [133]. No modelo experimental da PCM Loures *et al* (2009) demonstraram que

camundongos "knockout" para TLR2 apresentam resposta inflamatória descontrolada devido à diminuição no número de células T regulatórias, associada com um aumento da resposta Th17. Por outro lado, animais "knockout" para TLR4 foram caracterizados por uma resposta inflamatória diminuída, associada à expansão do número de células regulatórias [83, 84].

Como mencionado anteriormente, além de manifestar-se sob diferentes formas clínicas (forma adulta e forma juvenil), a paracoccidioidomicose (PCM) pode ocorrer na forma de infecção assintomática em indivíduos que moram em regiões endêmicas e entram em contato com o fungo, mas não desenvolvem a doença. Essa condição é denominada paracoccidioidomicose-infecção (PCM-infecção) e caracteriza-se pelo teste de HTT positivo a antígenos do fungo. Essas diferentes formas da paracoccidioidomicose se relacionam com o tipo de resposta imunológica desenvolvida após a infecção [134]. Diversas evidências têm apontado que a resposta envolvida na resistência ao *P. brasiliensis* é predominantemente Th1, enquanto que a suscetibilidade envolve uma resposta Th2 [134], fato observado tanto no modelo experimental [8-10], como na doença humana [12-15].

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram a confirmação dos achados anteriores, bem como uma melhor definição do tipo de resposta imune presente nas diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose. Desse modo, observamos que os indivíduos com a FJ da paracoccidioidomicose se caracterizam por uma resposta predominantemente Th2. É interessante notar o

caráter heterogêneo da resposta apresentada pelos indivíduos com a FA da PCM, que são capazes de produzir tanto citocinas Th1 e Th17, como citocinas Th2.

Dentre as citocinas Th1 o IFN- γ é a que caracteriza essa população [135, 136]. O IFN- γ desempenha um papel importante na ativação da resposta imune mediada por células, participando ativamente na resistência à infecção pelo *P. brasiliensis* [11, 12, 14]. Na paracoccidioidomicose o IFN- γ atua por meio da ativação de macrófagos, aumentando o seu metabolismo oxidativo, gerando assim intermediários reativos de oxigênio, como o H₂O₂ [54, 137], e de nitrogênio, principalmente o NO (óxido nítrico) [138-140], favorecendo a destruição do *P. brasiliensis*. Em camundongos, a produção de NO pode estar relacionada tanto à suscetibilidade quanto à resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*, sendo que a produção de quantidades elevadas desse mediador se relaciona à supressão da resposta imunológica observada nos camundongos suscetíveis, enquanto que níveis intermediários estariam relacionados à resistência [139]. Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que, como descrito anteriormente [16], a maior expressão do RNAm para IFN- γ foi detectada em indivíduos apresentando a FA da PCM. É interessante notar que o RNAm para o fator de transcrição responsável pela diferenciação de células Th1 (T-bet) encontra-se aumentado em células não estimuladas de pacientes com a FA, isso poderia explicar a maior produção do RNAm para IFN- γ (assim como da proteína) observada nesse grupo.

A expressão do RNAm de IL-4 (citocina característica da resposta Th2) nos diversos grupos analisados mostrou que os pacientes com paracoccidioidomicose-doença (principalmente aqueles com a FJ) expressam

precocemente grandes quantidades do RNAm para esta citocina, o que não ocorre com de controles normais. Também observamos que o fator de transcrição GATA-3 também foi mais expresso pelas células do grupo de pacientes com a FJ, mesmo em células não estimuladas. Em trabalho anterior, obtivemos resultados semelhantes [16] e demonstramos que células de indivíduos com a FJ e a FA da paracoccidioidomicose apresentam maior produção de IL-4 após estimulação com antígenos do fungo [14]. A IL-4 é a citocina que caracteriza a resposta Th2 tem importante função na inibição da resposta Th1 e atua na resposta humoral, principalmente induzindo a produção de anticorpos das classes IgG4 e IgE [141], caracteristicamente produzidos nas formas mais graves da paracoccidioidomicose [13, 17].

Camundongos suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* (B10.A) produzem quantidades elevadas de IL-4, ao lado de outras citocinas Th2 como IL-5, IL-10 e TGF- β [11, 142]. Pina *et al.* (2004) [143] demonstraram que camundongos C57BL/6 deficientes na produção de IL-4 são mais resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*, demonstrando que a deficiência dessa citocina leva a um aumento da produção de IFN- γ e diminuição da carga fúngica nos pulmões dos camundongos, associado a uma diminuição da produção de IL-5 e IL-10. Paradoxalmente, camundongos da linhagem B.10, quando tratados com anti-IL-4, apresentaram um aumento da carga fúngica nos pulmões após a infecção, sem alteração aparente da produção de citocinas; enquanto que camundongos C57BL/6 recebendo o mesmo tratamento apresentaram o mesmo fenótipo dos camundongos deficientes em IL-4 [144]. Esses dados indicam que a IL-4 pode

desempenhar um papel protetor ou prejudicial na resposta ao *P. brasiliensis*, dependendo de fatores genéticos do hospedeiro.

Em relação à produção de IL-17, pudemos evidenciar que as células de pacientes com a FA produzem e secretam maiores quantidades de IL-17, do que os outros grupos analisados. Além disso, observamos que o fator de transcrição Ror γ t (Rorc) é expresso em células dos pacientes com a FA não estimulada. Na paracoccidioidomicose ainda não existem trabalhos descrevendo o papel da IL-17 e de citocinas relacionadas às células Th17, contudo em um trabalho recente, foi descrito que nas lesões de mucosa e pele de pacientes com a FA da PCM, existe um grande número de células produtoras dessa citocina [145]. Ainda, na infecção experimental com conídios de *P. brasiliensis* observou-se produção aumentada de IL-17 provavelmente por células Th17 que ocorreu em torno de quatro semanas após a infecção [146].

As células Th17 já foram descritas como de extrema importância para a resposta imunológica em doenças causadas por fungos [34, 44-46]. No modelo experimental da infecção causada pelo *P. jirovecii*, a produção de IL-17 e IL-23, foi descrita como sendo importante na resposta protetora contra a doença [147]. Na infecção experimental por *H. capsulatum*, Heninger et al (2006) [148] demonstraram a presença de células produtoras de IFN- γ e IL-17 no granuloma formado em resposta ao fungo e que a IL-17 é necessária para a sua formação. Na infecção pelo *Cryptococcus neoformans*, a presença de IL-23 e consequentemente de IL-17 foi relacionada à resistência à doença por meio da indução de citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-6 [40]. Em relação à infecção por

C. albicans, existem trabalhos com resultados contraditórios, alguns apontam para a participação dessas células na resistência, e outros na suscetibilidade à infecção [39, 45, 149-153]. Além disso um trabalho recentemente publicado demonstrou que o background genético do indivíduo pode influenciar na geração de diferentes moléculas da família da IL-17 levando a resistência ou susceptibilidade a infecção [154]. Em um trabalho publicado por Zelante *et al.* (2007), os autores também verificaram que a IL-17 é importante na suscetibilidade à infecção pelo *A. fumigatus* e *C. albicans*, sendo que nas duas infecções esta citocina induz o aumento da atividade inflamatória na resposta inicial, que em última instância resulta em uma resposta celular deficiente, e em uma atividade fungicida de neutrófilos bastante reduzida, mas induzindo aumento da produção de MMP-9, associada à destruição tecidual [45]. No modelo experimental da paracoccidioidomicose foi demonstrado que a infecção leva a um aumento da produção de MMP-9 e MMP-2 por células do infiltrado inflamatório, tanto em animais resistentes como em animais suscetíveis, sendo essa produção associada à disseminação do fungo [155]. Dessa forma a maior produção de IL-17 nos pacientes com a FA poderia explicar o grande número de neutrófilos presentes nas lesões, e a produção exacerbada de MMP-9 poderia ser associado à destruição tecidual observada nesse grupo de pacientes.

Além disso, a presença de maior número de células Th17 na FA da PCM poderia explicar alguns fatos observados nesse grupo de pacientes que não são explicados pelo balanço Th1 e Th2. Células de pacientes com a forma adulta da doença quando estimuladas *in vitro* produzem quantidades elevadas de IL-

12p40/p70, detectadas tanto no sobrenadante de culturas [14], como por citometria de fluxo [15], não sendo observado, contudo, aumento na produção de IFN- γ [14]. Por outro lado, um estudo realizado para a detecção da IL-12p70 em sobrenadantes de culturas de células de pacientes demonstrou produção diminuída dessa citocina, bem como a diminuição de um dos componentes de seu receptor, a cadeia IL-12R β 2 [156]. Essa aparente contradição, talvez possa ser explicada quando se leva em consideração as características da IL-12 e das citocinas que compõe essa família de moléculas [157]. A IL-12 biologicamente ativas (IL-12p70) é uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades p40 e a p35, e apresenta um receptor composto por duas subunidades: IL-12R β 1 e IL12-R β 2. A subunidade p40 é compartilhada com outra citocina a IL-23 (composta das subunidades p40 e p19), citocina que também compartilha uma das subunidades do receptor da IL-12 (IL-12R β 1 em conjunto com a subunidade IL-23R) [157]. Devido a essa característica, os trabalhos que relatam a participação de IL-12 na resposta, tendo como base a detecção de IL-12p40 ou IL-12p40/p70 devem ser analisados com cautela, e muitas vezes a sua reavaliação demonstra que algumas das ações creditadas a IL-12 na verdade são exercidas pela IL-23 [158]. A IL-23, assim como a IL-12, é produzida principalmente por células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas), apresenta atividades pró-inflamatórias, e inicialmente foi apontada como responsável pela indução da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, em particular a IL-17 por linfócitos T [157, 159].

Além das células Th1, Th2 e Th17, recentemente foram descritas novas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ caracterizadas pela produção de citocinas específicas, demonstrando que essas células apresentam grande heterogeneidade. As células Th9 apresentam grande importância na produção de anticorpos, participando ativamente nessa função em conjunto com as células Th2 [66, 160]. Na tuberculose humana, foi demonstrado que a presença de IL-9 leva a uma resposta imune celular deficiente, interferindo diretamente na produção de citocinas do tipo Th1 [161]. Para a diferenciação de células produtoras de IL-9 é necessária a participação da IL-4, dessa forma, essa produção tardia poderia estar associada à produção da IL-4 pelas células dos pacientes. Essa citocina também poderia contribuir para a ativação policlonal dos linfócitos B, característica dos pacientes com PCM, particularmente naqueles com a FJ [17, 162, 163].

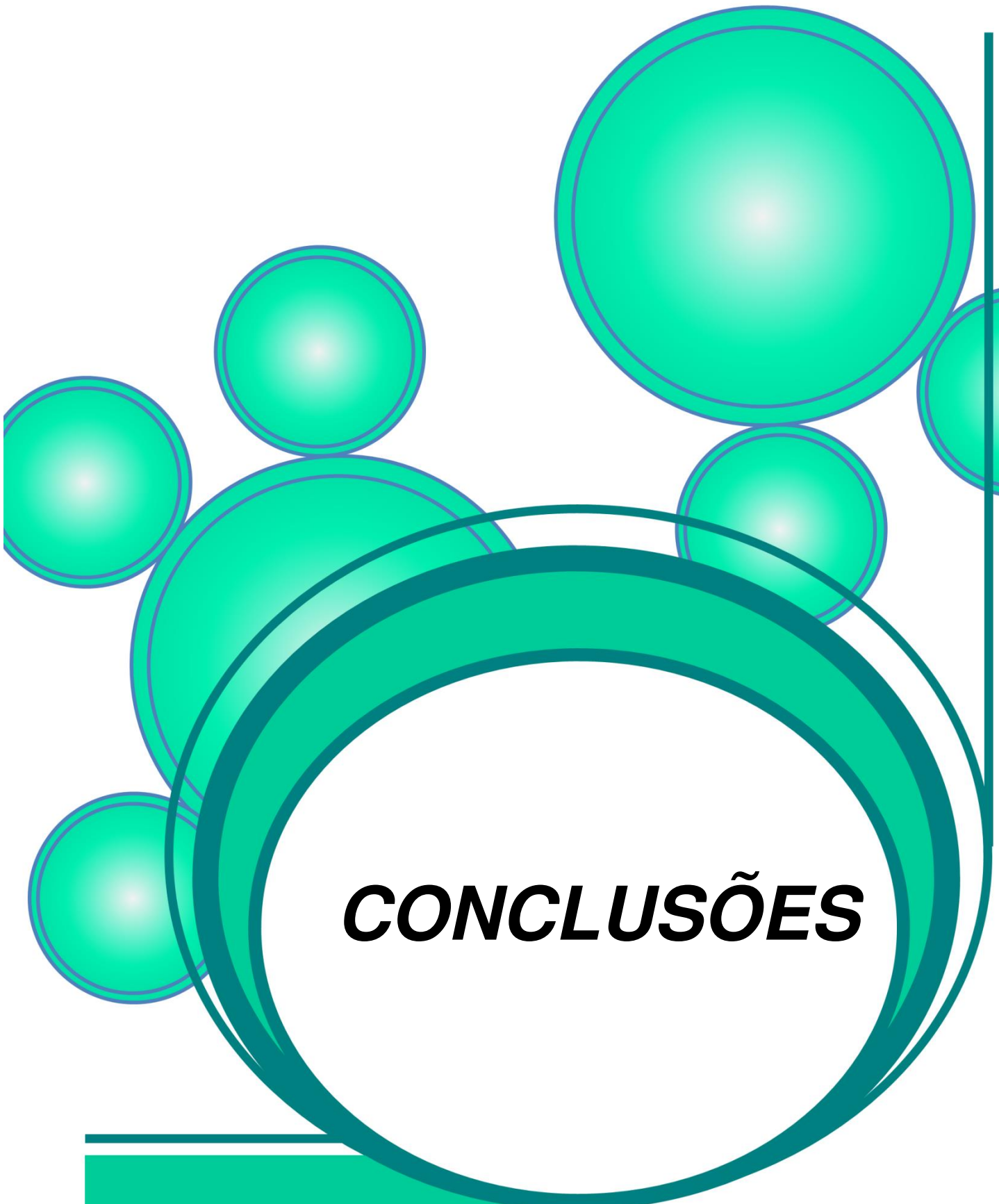
Em relação a IL-22, nossos resultados demonstraram uma maior produção do RNAm para essa citocina pelas células dos pacientes com PCM, independentemente da forma clínica, mas um pouco superior na FA. A IL-22 foi primeiramente associada às células Th17, mas recentemente foram descritas células capazes de produzir grandes quantidades de IL-22, sem contudo produzirem IL-17. A IL-22, é fundamental na defesa contra agentes bacterianos [69, 70] e contra o fungo *C. albicans* [71].

Além das diferentes subpopulações de células efetoras, os linfócitos T também podem se diferenciar em células com atividade regulatória. Uma característica bem descrita da PCM é a depressão da resposta imunológica celular, evidenciada pela anergia ao HTT e a proliferação de linfócitos diminuída

frente a antígenos do fungo, que têm sido apontada em estudos desde a década de 70 [164-166]. Paralelamente, achados semelhantes foram feitos em modelo experimental no qual os animais apresentaram resposta imune celular prejudicada aos antígenos do fungo [167], sendo que a transferência adotiva de células de linfonodo e baço de animais inoculados com *P. brasiliensis*, torna animais sadios pouco responsivos ao HTT [168]. Os mecanismos envolvidos nesta imunossupressão ainda não estão totalmente descritos, mas parecem relacionar-se com o desequilíbrio no perfil de citocinas produzidas. Em trabalho recente, nosso grupo descreveu que em pacientes com PCM, existe um maior número de células regulatórias, que foram associadas à supressão observada nos pacientes [133]. Os dados obtidos, confirmaram esses achados prévios, com um maior expressão do RNAm para FoxP3 por células de pacientes com PCM, mesmo não estimuladas, que como mencionado também apresentaram a maior expressão do RNAm para IL-17. A produção de IL-10 foi superior nas culturas de células de pacientes a doença, refletindo uma maior presença de células regulatórias nesses pacientes. Apesar de esses resultados parecerem contraditórios, diversos estudos recentes apontam para uma relação entre a presença de células regulatórias (consequentemente de FoxP3) e a diferenciação de células Th17, havendo portanto um balanço entre essas duas populações de linfócitos T [169-171].

Os resultados obtidos podem indicar que na paracoccidioidomicose humana, os diferentes padrões de resposta imunológica celular levam a diferentes manifestações clínicas da doença. Assim, tendo em vista os dados que obtivemos e dados anteriores publicados por nosso grupo, juntamente com os dados já pré-

estabelecidos na literatura, propomos um novo modelo para explicar as diferenças entre as formas da PCM (**ver figura 8.2 - apêndice**). A resistência apresentada pelos indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção (indivíduos PI) seria mediada pelo predomínio de uma resposta Th1, responsável pela ativação de macrófagos, que são as células mais importantes na resistência à infecção [3,88]. As formas mais graves da doença caracterizadas por uma maior suscetibilidade apresentadas por indivíduos com a forma juvenil seriam mediadas por uma resposta Th2 / Th9, células responsáveis pela indução de uma resposta imune humoral, bem como, o aumento do número de eosinófilos [10,16]. Enquanto que as formas mais brandas, mas que apresentam resposta inflamatória crônica característica de pacientes com a forma adulta, apresentam um predomínio da resposta Th17, com participação importante de células Th1. A resposta Th17 nesses pacientes, embora possa contribuir para a resistência parcial à infecção, poderia contribuir para a uma resposta inflamatória exacerbada, com a ativação de neutrófilos, levando a destruição tecidual observada nesse grupo de pacientes e, consequentemente a fibrose.

An abstract graphic featuring several teal circles of varying sizes, some with a gradient and a dark teal outline. A large, thick, dark teal ring is positioned in the lower half of the image, framing the text. A vertical teal line is on the right side, and a horizontal teal bar is at the bottom left.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- Células Dendríticas (DCs) derivadas de monócitos são capazes de reconhecer células leveduriformes de *P. brasiliensis*, e após esse reconhecimento são ativadas passando a expressar fenótipo de células maduras e a produzir citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos T.
- O reconhecimento das células leveduriformes pelas DCs envolve ao menos parcialmente as moléculas de Dectina-1 e TLR-2.
- DCs estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de modular a diferenciação de células TCD3⁺CD4⁺ em células produtoras de IFN- γ , IL-17, IL-22, IL-4 e IL-9.
- Pacientes com paracoccidioidomicose diferem quanto ao fenótipo dos linfócitos T presentes na circulação periférica. Pacientes com a forma juvenil apresentam predomínio de células Th2/Th9, enquanto que pacientes com FA apresentam uma resposta imunológica adaptativa mista, com predomínio de células Th17, mas com participação importante de células Th1 e Th2.

The page features a decorative background with several teal-colored circles of varying sizes, some with a gradient effect. A large, thick teal ring is positioned in the lower half of the page, framing the title. A vertical teal line runs along the right edge, and a horizontal teal bar is at the bottom left.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brummer, E., E. Castaneda, A. Restrepo. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev, 1993, **6** (2):89-117.
2. Blotta, M.H., R.L. Mamoni, S.J. Oliveira, S.A. Nouer, P.M. Papaiordanou, A. Goveia, *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. Am J Trop Med Hyg, 1999, **61** (3):390-4.
3. Shikanai-Yasuda, M., F.Q. Telles Filho, R.P. Mendes, A.L. Colombo, M.L. Moretti. Consenso em paracoccidioidomicose. Rev Soc Bras Med Trop, 2006, **39** (3):297-310.
4. Franco, M., M.R. Montenegro, R.P. Mendes, S.A. Marques, N.L. Dillon, N.G. Mota. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop, 1987, **20** (2):129-32.
5. Castaneda, E., E. Brummer, D. Pappagianis, D.A. Stevens. Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. Infect Immun, 1988, **56** (7):1771-7.
6. Benard, G., M.J. Mendes-Giannini, M. Juvenale, E.T. Miranda, A.J. Duarte. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis, 1997, **175** (5):1263-7.
7. Calich, V.L., L.M. Singer-Vermes, A.M. Siqueira, E. Burger. Susceptibility and resistance of inbred mice to Paracoccidioides brasiliensis. Br J Exp Pathol, 1985, **66** (5):585-94.

8. Cano, L.E., L.M. Singer-Vermes, C.A. Vaz, M. Russo, V.L. Calich. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun*, 1995, **63** (5):1777-83.
9. Cano, L.E., S.S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C.F. Xidieh, L.M. Singer-Vermes, *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, 1998, **66** (2):800-6.
10. Vaz, C.A., L.M. Singer-Vermes, V.L. Calich. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59** (6):971-7.
11. Kashino, S.S., R.A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L.H. Meloni-Bruneri, C.A. Vaz, E. Burger, *et al.* Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, **20** (1):89-97.
12. Benard, G., C.C. Romano, C.R. Cacere, M. Juvenale, M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 2001, **13** (4):248-52.
13. Mamoni, R.L., S.A. Nouer, S.J. Oliveira, C.C. Musatti, C.L. Rossi, Z.P. Camargo, *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.
14. Oliveira, S.J., R.L. Mamoni, C.C. Musatti, P.M. Papaiordanou, M.H. Blotta. 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.
 15. Mamoni, R.L., M.H. Blotta. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 2006, **35** (3-4):207-16.
 16. Mamoni, R.L., M.H. Blotta. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*, 2005, **32** (1):20-9.
 17. Baida, H., P.J. Biselli, M. Juvenale, G.M. Del Negro, M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte, *et al.* Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 1999, **1** (4):273-8.
 18. Mamoni, R.L., C.L. Rossi, Z.P. Camargo, M.H. Blotta. 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.
 19. Kaminagakura, E., P.R. Bonan, J. Jorge, O.P. Almeida, C. Scully. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. *Oral Dis*, 2007, **13** (4):434-9.

20. Pereira, R.M., F. Bucarechi, M. Barison Ede, G. Hessel, A.T. Tresoldi. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2004, **46** (3):127-31.
21. Wagner, J.M., M. Franco, G.M. Kephart, G.J. Gleich. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59** (1):66-72.
22. Pina, A., S. Bernardino, V.L. Calich. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J Leukoc Biol*, 2008, **83** (5):1088-99.
23. Calich, V.L., T.A. da Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F.V. Loures, *et al.* Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, 2008, **165** (4-5):223-36.
24. Corvino, C.L., R.L. Mamoni, G.Z. Fagundes, M.H. Blotta. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol*, 2007, **147** (3):483-90.
25. Pina, A., P.H. Saldiva, L.E. Restrepo, V.L. Calich. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol*, 2006, **79** (6):1202-13.
26. Harrington, L.E., P.R. Mangan, C.T. Weaver. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006, **18** (3):349-56.
27. Bettelli, E., T. Korn, V.K. Kuchroo. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 2007, **19** (6):652-7.

28. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 2005, **6** (11):1123-32.
29. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 2005, **6** (11):1133-41.
30. Matsuzaki, G.,M. Umemura. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol*, 2007, **51** (12):1139-47.
31. Palm, N.W.,R. Medzhitov. Antifungal defense turns 17. *Nat Immunol*, 2007, **8** (6):549-51.
32. Khader, S.A.,A.M. Cooper. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, 2008, **41** (2):79-83.
33. Kelly, M.N., J.K. Kolls, K. Happel, J.D. Schwartzman, P. Schwarzenberger, C. Combe, *et al.* Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*, 2005, **73** (1):617-21.
34. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2011, **11** (4):275-88.
35. Feinen, B., A.E. Jerse, S.L. Gaffen, M.W. Russell. Critical role of Th17 responses in a murine model of *Neisseria gonorrhoeae* genital infection. *Mucosal Immunol*, 2010, **3** (3):312-21.

36. Miyazaki, Y., S. Hamano, S. Wang, Y. Shimanoe, Y. Iwakura, H. Yoshida. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 2010, **185** (2):1150-7.
37. Scriba, T.J., B. Kalsdorf, D.A. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, *et al.* Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol*, 2008, **180** (3):1962-70.
38. Zenaro, E., M. Donini, S. Dusi. Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol*, 2009, **86** (6):1393-401.
39. Curtis, M.M., S.S. Way. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 2009, **126** (2):177-85.
40. Kleinschek, M.A., U. Muller, S.J. Brodie, W. Stenzel, G. Kohler, W.M. Blumenschein, *et al.* IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol*, 2006, **176** (2):1098-106.
41. Khader, S.A., G.K. Bell, J.E. Pearl, J.J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G.E. Cilley, *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*, 2007, **8** (4):369-77.
42. Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M.D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, *et al.* IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*, 2007, **178** (6):3786-96.

43. Wozniak, T.M., A.A. Ryan, W.J. Britton. Interleukin-23 restores immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-12p40-deficient mice and is not required for the development of IL-17-secreting T cell responses. *J Immunol*, 2006, **177** (12):8684-92.
44. Huang, W., L. Na, P.L. Fidel, P. Schwarzenberger. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis*, 2004, **190** (3):624-31.
45. Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, *et al.* IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*, 2007, **37** (10):2695-706.
46. Romani, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol*, 2008, 1-15.
47. Linden, A., H. Hoshino, M. Laan. Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J*, 2000, **15** (5):973-7.
48. Ivanov, S., S. Bozinovski, A. Bossios, H. Valadi, R. Vlahos, C. Malmhall, *et al.* Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, **36** (4):442-51.
49. Aujla, S.J., P.J. Dubin, J.K. Kolls. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res*, 2007, **33** (10):507-18.
50. Silva, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol*, 2010, **87** (5):805-13.
51. Dale, D.C., L. Boxer, W.C. Liles. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 2008, **112** (4):935-45.

52. Vilani-Moreno, F., D. Fecchio, M.C. de Mattos, M. Moscardi-Bacchi, J. Defaveri, M. Franco. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. susceptible mice. *Mycopathologia*, 1998, **141** (2):79-91.
53. Fornazim, M.C., A. Balthazar, R. Quagliato, Jr., R.L. Mamoni, C. Garcia, M.H. Blotta. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J*, 2003, **22** (6):895-9.
54. Calvi, S.A., A.M. Soares, M.T. Peracoli, M. Franco, R.L. Ruiz, Jr., J. Marcondes-Machado, *et al.* Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. *Microbes Infect*, 2003, **5** (15):1373-9.
55. Neworal, E.P., A. Altemani, R.L. Mamoni, I.L. Noronha, M.H. Blotta. 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.
56. Weaver, C.T., R.D. Hatton, P.R. Mangan, L.E. Harrington. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007, **25** 821-52.
57. Zhou, L., M.M. Chong, D.R. Littman. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 2009, **30** (5):646-55.
58. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 2007, **13** (2):139-45.

59. Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 2007, **8** (6):639-46.
60. O'Shea, J.J., S.M. Steward-Tharp, A. Laurence, W.T. Watford, L. Wei, A.S. Adamson, *et al.* Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect*, 2009, **11** (5):599-611.
61. Santarlasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, *et al.* TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol*, 2009, **39** (1):207-15.
62. Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, F. Annunziato. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol*, 2009,
63. Romagnani, S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther*, 2008, **10** (2):206.
64. Yang, X.O., B.P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H.S. Kang, Y. Chung, *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 2008, **28** (1):29-39.
65. Wong, M.T., J.J. Ye, M.N. Alonso, A. Landrigan, R.K. Cheung, E. Engleman, *et al.* Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol*, 2010, **88** (6):624-31.
66. Soroosh, P., T.A. Doherty. Th9 and allergic disease. *Immunology*, 2009, **127** (4):450-8.
67. Zheng, Y., P.A. Valdez, D.M. Danilenko, Y. Hu, S.M. Sa, Q. Gong, *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*, 2008, **14** (3):282-9.

68. Sonnenberg, G.F., L.A. Monticelli, M.M. Elloso, L.A. Fouser, D. Artis. CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity*, **34** (1):122-34.
69. Aujla, S.J., J.K. Kolls. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med*, 2009, **87** (5):451-4.
70. Aujla, S.J., Y.R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D.J. Askew, D.A. Pociask, *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med*, 2008, **14** (3):275-81.
71. De Luca, A., T. Zelante, C. D'Angelo, S. Zagarella, F. Fallarino, A. Spreca, *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol*, 2010, **3** (4):361-73.
72. Zelante, T., R. Iannitti, A. De Luca, L. Romani. IL-22 in antifungal immunity. *Eur J Immunol*, 2011, **41** (2):270-5.
73. Trifari, S., C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, H. Spits. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, 2009, **10** (8):864-71.
74. Chang, H.C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G.L. Stritesky, *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, **11** (6):527-34.
75. Medzhitov, R., C.A. Janeway, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997, **91** (3):295-8.
76. Zak, D.E., A. Aderem. Systems biology of innate immunity. *Immunol Rev*, 2009, **227** (1):264-82.

77. Iwasaki, A.,R. Medzhitov. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, **327** (5963):291-5.
78. Chai, L.Y., M.G. Netea, A.G. Vonk, B.J. Kullberg. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol*, 2009, **47** (3):227-36.
79. Sabatte, J., J. Maggini, K. Nahmod, M.M. Amaral, D. Martinez, G. Salamone, *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.
80. Pasare, C.,R. Medzhitov. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003, **299** (5609):1033-6.
81. Pasare, C.,R. Medzhitov. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*, 2004, **21** (5):733-41.
82. Calich, V.L., A. Pina, M. Felonato, S. Bernardino, T.A. Costa, F.V. Loures. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, **53** (1):1-7.
83. Loures, F.V., A. Pina, M. Felonato, V.L. Calich. 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.
84. Loures, F.V., A. Pina, M. Felonato, E.F. Araujo, K.R. Leite, V.L. Calich. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun*, **78** (3):1078-88.

85. Bonfim, C.V., R.L. Mamoni, M.H. Blotta. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*, 2009, **47** (7):722-33.
86. Acorci-Valerio, M.J., A.P. Bordon-Graciani, L.A. Dias-Melicio, M. de Assis Golim, E. Nakaira-Takahagi, A.M. de Campos Soares. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol*, **71** (2):99-108.
87. Taylor, P.R., S.V. Tsoni, J.A. Willment, K.M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, *et al.* Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol*, 2007, **8** (1):31-8.
88. Hohl, T.M., A. Rivera, E.G. Pamer. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*, 2006, **18** (4):465-72.
89. Brown, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6** (1):33-43.
90. Goodridge, H.S., A.J. Wolf, D.M. Underhill. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*, 2009, **230** (1):38-50.
91. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M.J. Robinson, F. Osorio, E.C. Slack, S.V. Tsoni, *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*, 2007, **8** (6):630-8.
92. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, F. Sallusto. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 2007, **8** (9):942-9.

93. Evans, H.G., T. Suddason, I. Jackson, L.S. Taams, G.M. Lord. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104** (43):17034-9.
94. Liu, K.,M.C. Nussenzweig. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*, **234** (1):45-54.
95. Pereira, S.R., V.M. Faca, G.G. Gomes, R. Chammas, A.M. Fontes, D.T. Covas, *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.
96. Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, K. Ley. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, **327** (5966):656-61.
97. Kvistborg, P., M. Boegh, A.W. Pedersen, M.H. Claesson, M.B. Zocca. Fast generation of dendritic cells. *Cell Immunol*, 2009, **260** (1):56-62.
98. Wu, L.,Y.J. Liu. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*, 2007, **26** (6):741-50.
99. Bar-On, L.,S. Jung. Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunol Rev*, **234** (1):76-89.
100. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23** 275-306.

101. Blasius, A.L.,M. Colonna. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. Trends Immunol, 2006, **27** (6):255-60.
102. Auffray, C., M.H. Sieweke, F. Geissmann. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2009, **27** 669-92.
103. Conti, L.,S. Gessani. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. Immunobiology, 2008, **213** (9-10):859-70.
104. Sallusto, F.,A. Lanzavecchia. 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.
105. Romani, L., P. Puccetti, A. Mencacci, R. Spaccapelo, E. Cenci, L. Tonnetti, *et al.* Tolerance to staphylococcal enterotoxin B initiated Th1 cell differentiation in mice infected with Candida albicans. Infect Immun, 1994, **62** (9):4047-53.
106. Romani, L., A. Mencacci, L. Tonnetti, R. Spaccapelo, E. Cenci, P. Puccetti, *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.
107. Schmid, M.A., D. Kingston, S. Boddupalli, M.G. Manz. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. Immunol Rev, **234** (1):32-44.
108. Ferreira, K.S., J.D. Lopes, S.R. Almeida. 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.

109. Almeida, S.R.,J.D. Lopes. 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.
110. Ferreira, K.S., J.D. Lopes, S.R. Almeida. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett*, 2004, **94** (1-2):107-14.
111. Ferreira, K.S.,S.R. Almeida. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *Immunol Lett*, 2006, **103** (2):121-6.
112. Ferreira, K.S., K.R. Bastos, M. Russo, S.R. Almeida. 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.
113. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29** (9):e45.
114. Yoshida, H., M. Nakaya, Y. Miyazaki. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J Leukoc Biol*, 2009, **86** (6):1295-303.
115. Gordon, S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*, 2007, **37 Suppl 1** S9-17.
116. Elkord, E., P.E. Williams, H. Kynaston, A.W. Rowbottom. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*, 2005, **114** (2):204-12.

117. Aerts-Toegaert, C., C. Heirman, S. Tuyaerts, J. Corthals, J.L. Aerts, A. Bonehill, *et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*, 2007, **37** (3):686-95.
118. Cao, W., S.H. Lee, J. Lu. 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.
119. Gogolak, P., B. Rethi, I. Szatmari, A. Lanyi, B. Dezso, L. Nagy, *et al.* Differentiation of CD1a⁻ and CD1a⁺ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood*, 2007, **109** (2):643-52.
120. Geijtenbeek, T.B., A. Engering, Y. Van Kooyk. 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.
121. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, C. Vaure, K. Chemin, *et al.* Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation*, 2002, **73** (1 Suppl):S7-11.
122. Laurence, A.,J.J. O'Shea. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol*, 2007, **8** (9):903-5.
123. McGeachy, M.J.,D.J. Cua. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, 2008, **28** (4):445-53.
124. Manel, N., D. Unutmaz, D.R. Littman. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol*, 2008,
125. Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and

- proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 2008,
126. Wilson, N.J., K. Boniface, J.R. Chan, B.S. McKenzie, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 2007, **8** (9):950-7.
 127. Gil, M.L., D. Gozalbo. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci*, 2009, **14** 570-82.
 128. Loures, F.V., A. Pina, M. Felonato, C. Feriotti, E.F. de Araujo, V.L. Calich. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Infect Immun*, 2011, **79** (6):2470-80.
 129. Cheng, S.C., F.L. van de Veerdonk, M. Lenardon, M. Stoffels, T. Plantinga, S. Smeekens, *et al.* The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol*, 2011,
 130. Dillon, S.M., L.M. Rogers, R. Howe, L.A. Hostetler, J. Buhrman, M.D. McCarter, *et al.* Human intestinal lamina propria CD1c⁺ dendritic cells display an activated phenotype at steady state and produce IL-23 in response to TLR7/8 stimulation. *J Immunol*, 2010, **184** (12):6612-21.
 131. Suttmoller, R.P., M.H. den Brok, M. Kramer, E.J. Bennink, L.W. Toonen, B.J. Kullberg, *et al.* Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2006, **116** (2):485-94.
 132. Netea, M.G., R. Suttmoller, C. Hermann, C.A. Van der Graaf, J.W. Van der Meer, J.H. van Krieken, *et al.* Toll-like receptor 2 suppresses immunity

- against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*, 2004, **172** (6):3712-8.
133. Ferreira, M.C., R.T. de Oliveira, R.M. da Silva, M.H. Blotta, R.L. Mazoni. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, 2010, **78** (10):4392-401.
134. Calich, V.L., C.A. Vaz, E. Burger. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*, 1998, **149** (4-5):407-17; discussion 499-500.
135. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, R.L. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986, **136** (7):2348-57.
136. Mosmann, T.R., R.L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989, **7** 145-73.
137. Calvi, S.A., M.T. Peracoli, R.P. Mendes, J. Marcondes-Machado, D. Fecchio, S.A. Marques, *et al.* Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect*, 2003, **5** (2):107-13.
138. Gonzalez, A., W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo, L.E. Cano. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun*, 2000, **68** (5):2546-52.

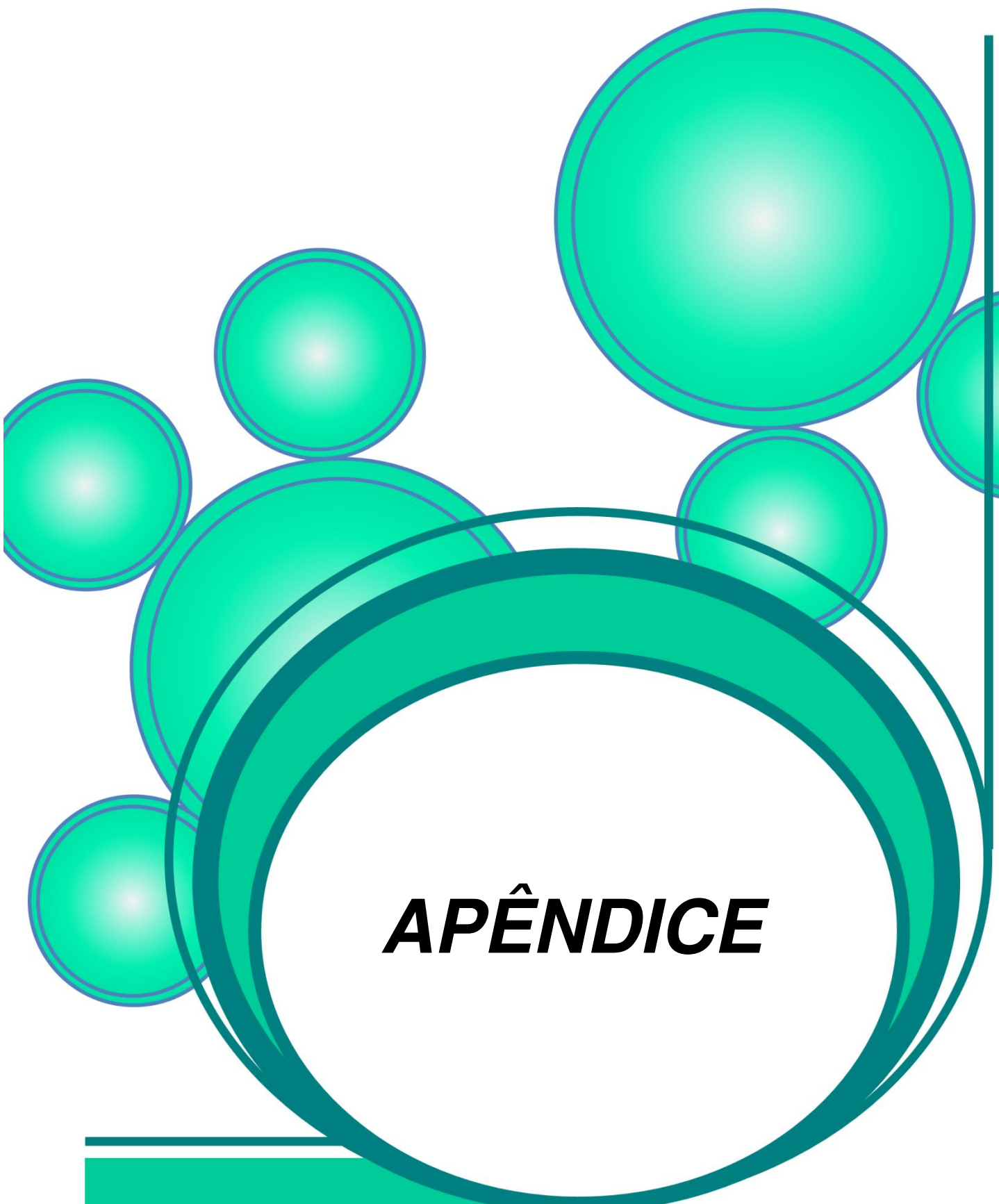
139. Nascimento, F.R., V.L. Calich, D. Rodriguez, M. Russo. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol*, 2002, **168** (9):4593-600.
140. Moreira, A.P., L.A. Dias-Melicio, M.T. Peracoli, S.A. Calvi, A.M. Victoriano de Campos Soares. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia*, 2008, **166** (1):17-23.
141. Snapper, C.M., F.D. Finkelman, W.E. Paul. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunol Rev*, 1988, **102** 51-75.
142. Calich, V.L., S.S. Kashino. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res*, 1998, **31** (5):615-23.
143. Pina, A., R.C. Valente-Ferreira, E.E. Molinari-Madlum, C.A. Vaz, A.C. Keller, V.L. Calich. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect Immun*, 2004, **72** (4):2369-78.
144. Arruda, C., R.C. Valente-Ferreira, A. Pina, S.S. Kashino, R.A. Fazioli, C.A. Vaz, *et al.* Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun*, 2004, **72** (7):3932-40.

145. Pagliari, C., E.R. Fernandes, F.W. Stegun, W.L. da Silva, M.I. Seixas Duarte, M.N. Sotto. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog*, 2011,
146. Lopera, D., T.W. Naranjo, O.G. Cruz, A. Restrepo, L.E. Cano, H.L. Lenzi. Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, **5** (7):e1232.
147. Rudner, X.L., K.I. Happel, E.A. Young, J.E. Shellito. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun*, 2007, **75** (6):3055-61.
148. Heninger, E., L.H. Hogan, J. Karman, S. Macvilay, B. Hill, J.P. Woods, *et al.* Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol*, 2006, **177** (5):3303-13.
149. Gaffen, S.L., N. Hernandez-Santos, A.C. Peterson. IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol Res*, 2011, **50** (2-3):181-7.
150. Liu, J.Z., M. Pezeshki, M. Raffatellu. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine*, 2009, **48** (1-2):156-60.
151. Lin, L., A.S. Ibrahim, X. Xu, J.M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, *et al.* Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog*, 2009, **5** (12):e1000703.

152. Conti, H.R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J.N. Sun, M.J. Lindemann, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*, 2009, **206** (2):299-311.
153. Eyerich, K., S. Foerster, S. Rombold, H.P. Seidl, H. Behrendt, H. Hofmann, *et al.* Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol*, 2008, **128** (11):2640-5.
154. Carvalho, A., G. Giovannini, A. De Luca, C. D'Angelo, A. Casagrande, R.G. Iannitti, *et al.* Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cell Mol Immunol*, 2012, **9** (3):276-86.
155. Nishikaku, A.S., L.C. Ribeiro, R.F. Molina, B.P. Albe, S. Cunha Cda, E. Burger. Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Int J Exp Pathol*, 2009, **90** (5):527-37.
156. Romano, C.C., M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte, G. Benard. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol*, 2005, **114** (1):86-94.
157. Hunter, C.A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*, 2005, **5** (7):521-31.
158. Cooper, A.M., A. Solache, S.A. Khader. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr Opin Immunol*, 2007, **19** (4):441-7.
159. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, D.J. Cua. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 2006, **27** (1):17-23.

160. Neill, D.R., A.N. McKenzie. TH9 cell generation. TH9: the latest addition to the expanding repertoire of IL-25 targets. *Immunol Cell Biol*, 2010, **88** (5):502-4.
161. Wu, B., C. Huang, M. Kato-Maeda, P.C. Hopewell, C.L. Daley, A.M. Krensky, *et al.* IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clin Immunol*, 2008, **126** (2):202-10.
162. Chequer-Bou-Habib, D., C. Daniel-Ribeiro, D.M. Banic, A.C. do Valle, B. Galvao-Castro. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. Polyclonal activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 1989, **108** (2):89-93.
163. Juvenale, M., G.M. Del Negro, A.J. Duarte, G. Benard. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol*, 2001, **50** (2):127-34.
164. Musatti, C.C., M.T. Rezkallah, E. Mendes, N.F. Mendes. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol*, 1976, **24** (2):365-78.
165. Restrepo, A., M. Restrepo, F. de Restrepo, L.H. Aristizabal, L.H. Moncada, H. Velez. Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia*, 1978, **16** (2):151-63.
166. Mota, N.G., M.T. Rezkallah-Iwasso, M.T. Peracoli, R.C. Audi, R.P. Mendes, J. Marcondes, *et al.* Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1985, **79** (6):765-72.

167. Singer-Vermes, L.M., C.B. Caldeira, E. Burger, L.G. Calich. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. Clin Exp Immunol, 1993, **94** (1):75-9.
168. Jimenez-Finkel, B.E.,J.W. Murphy. Characterization of efferent T suppressor cells induced by Paracoccidioides brasiliensis-specific afferent T suppressor cells. Infect Immun, 1988, **56** (4):744-50.
169. Diaconu, C.C., A.I. Neagu, R. Lungu, G. Tardei, I. Alexiu, C. Bleotu, *et al.* Plasticity of regulatory T cells under cytokine pressure. Roum Arch Microbiol Immunol, 2011, **69** (4):190-6.
170. Chen, Y., C.J. Haines, I. Gutcher, K. Hochweller, W.M. Blumenschein, T. McClanahan, *et al.* Foxp3(+) Regulatory T Cells Promote T Helper 17 Cell Development In Vivo through Regulation of Interleukin-2. Immunity, 2011, **34** (3):409-21.
171. Ziegler, S.F.,J.H. Buckner. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. Microbes Infect, 2009, **11** (5):594-8.

An abstract graphic design featuring several teal-colored circles of varying sizes. A large, thick teal ring is positioned in the lower half of the page, framing the text. To the right, a thin vertical teal line extends from the top to the bottom of the page. At the bottom left, there is a horizontal teal bar. The word "APÊNDICE" is centered within the large ring.

APÊNDICE

8. APÊNDICE

8.1. Diferenciação e caracterização de células dendríticas a partir de monócitos (células CD14⁺)

Na figura abaixo pode ser visualizado o resultado representativo da cinética de diferenciação das células dendríticas, acompanhadas no dia 0 (monócitos separados das CMNs), e após 2 dias (D2) e 5 dias de cultura na presença de IL-4 e GM-CSF. Um importante marcador para a análise de células dendríticas é a presença do CD14 que é característico de monócitos, mas que é pouco expresso em células dendríticas. Como é possível observar no histograma as células dendríticas apresentam diminuição da expressão do marcador CD14 ao longo do período de diferenciação e baixa expressão após 5 dias de diferenciação. É possível observar aumento de expressão bastante acentuado dos marcadores de ativação CD80 e CD86 que estão relacionados a ativação celular das células apresentadoras de antígenos e que ligam-se ao CD28 dos linfócitos promovendo também a sua ativação, esses marcadores são bastante expressos por células dendríticas mas pouco expressos em monócitos.

O CD11c é atualmente considerado o marcador mais importante para células dendríticas de origem mielóide, os resultados abaixo apresentados mostram elevada expressão desse marcador em células dendríticas após 5 dias de cultura. Quanto aos marcadores de células dendríticas imaturas e que relacionam-se com o reconhecimento de padrões moleculares de patógenos como o TLR2, TLR4, dectina-1 estes encontram-se aumentados nas células dendríticas diferenciadas in vitro como é possível observar nos histogramas da figura 8.1. A

expressão de CD205 (DC-SIGN) e CD209 que são marcadores relacionados a atividade de fagocitose também aumenta nas células dendríticas após a diferenciação (D5) em comparação aos monócitos (D0). Outro marcador importante é o HLA-DR (MHCII) que é pouco expresso em monócitos mas que é fortemente expresso em células apresentadoras de antígenos. Também na diferenciação aqui apresentada é possível verificar que ocorre aumento substancial na expressão de HLA-DR em células dendríticas diferenciadas.

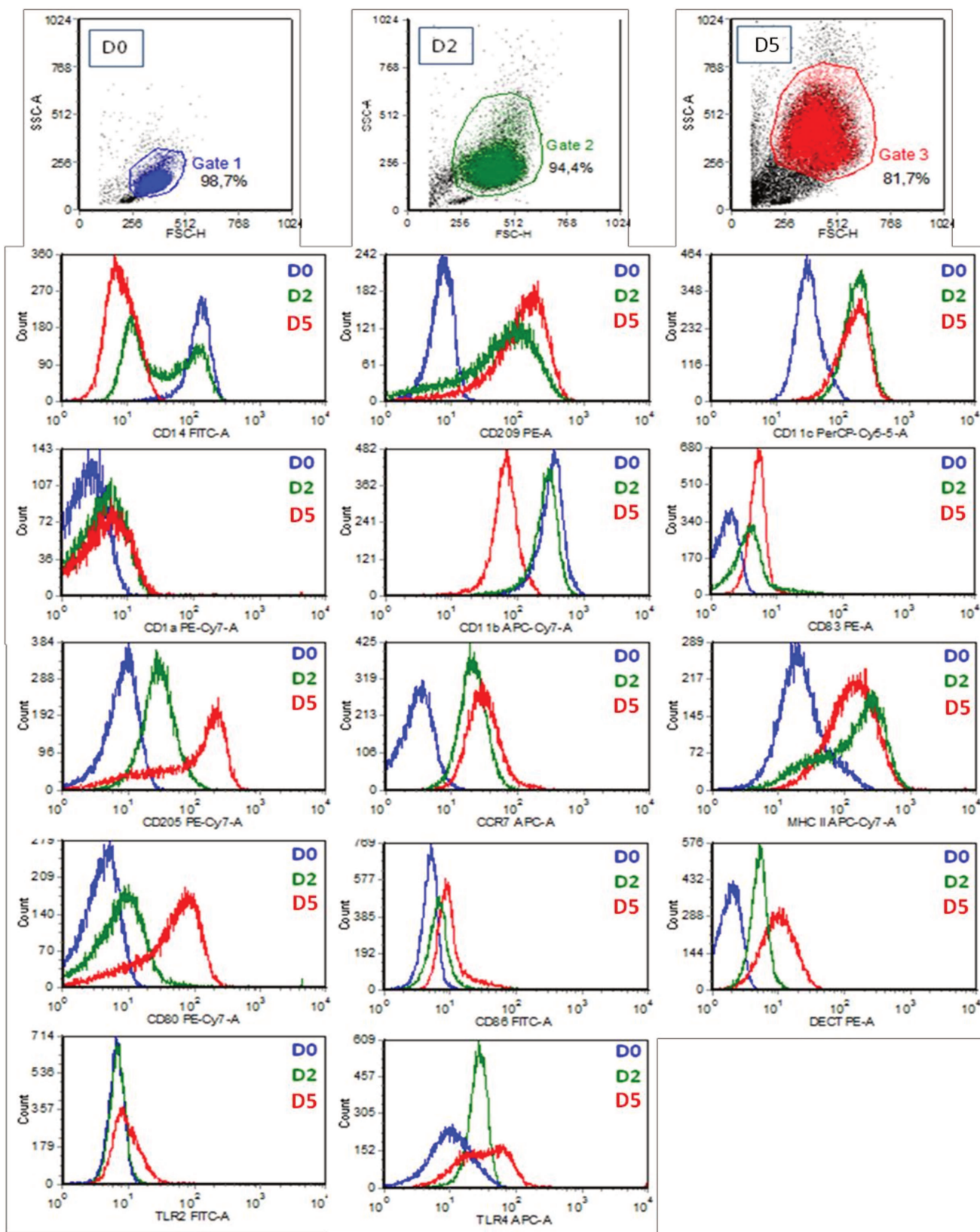


Figura 8.1 (página anterior): “Dot-plots” representativos da análise por citometria de fluxo da distribuição por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da cinética de diferenciação de monócitos do sangue periférico em células dendríticas (D0=monócitos, D2 e D5 = culturas estimuladas com GM-CSF e IL-4 por dois e cinco 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 = D5) destacados nos “dot-plots”. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células em cada gate.

8.2. Modelo proposto com os diferentes tipos de resposta imunológica observados nas diferentes formas da PCM humana

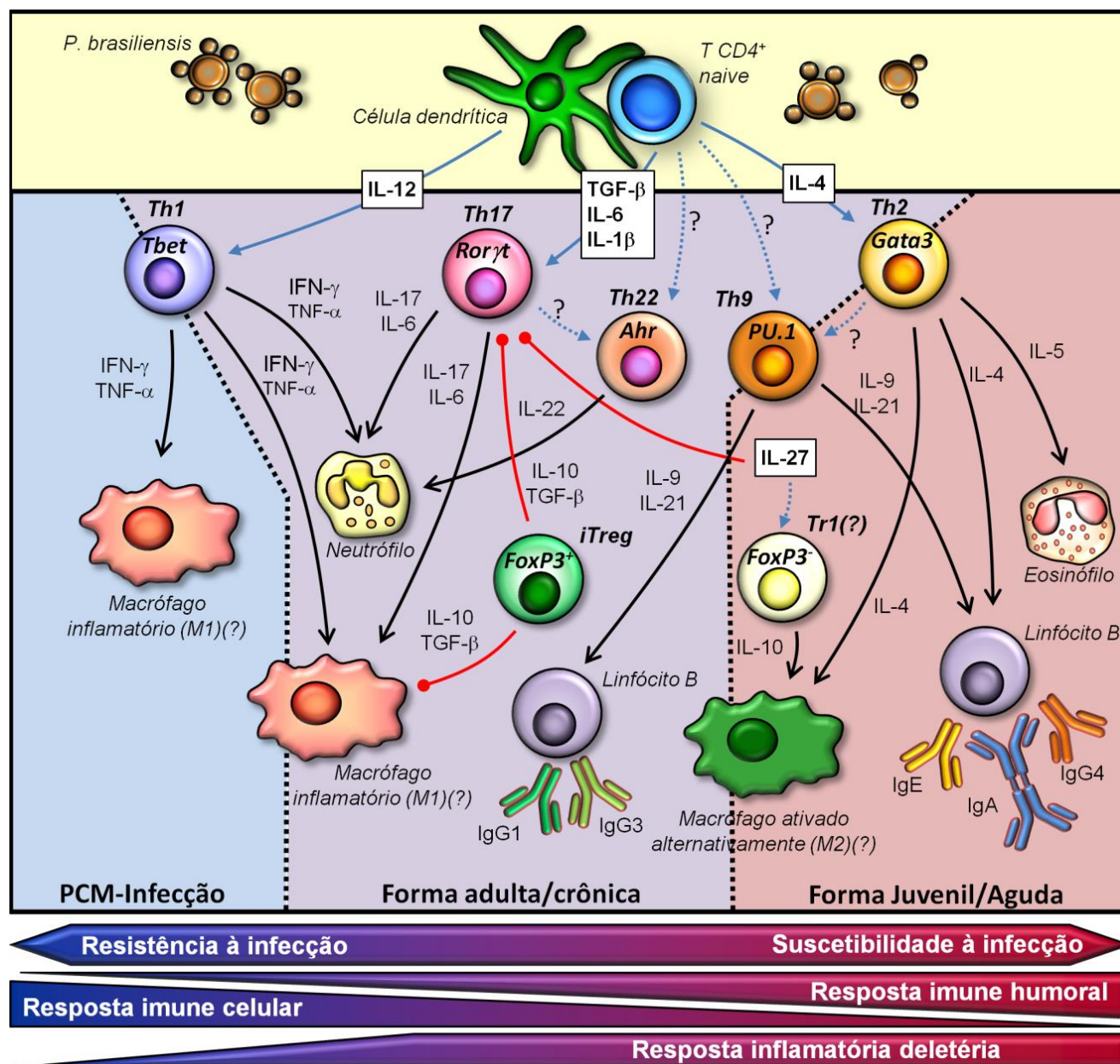


Figura 8.2 (página anterior): Modelo proposto para explicar as diferentes respostas imunológicas observadas nas formas clínicas da Paracoccidioidomicose humana. As diferentes formas da PCM humana apresentam diferenças na resposta imunológica desenvolvida na infecção pelo *P. brasiliensis*. A Paracoccidioidomicose-infecção (PCM-infecção) poderia ser caracterizada pelo predomínio da resposta Th1 com a produção de IFN- γ , o qual seria responsável pela ativação de macrófagos (macrófagos inflamatórios – M1) importante para a resistência à infecção. A forma aguda/juvenil poderia ser descrita como o polo de susceptibilidade da doença, apresentando uma resposta imunológica predominantemente humoral com ativação de células Th2 (produtoras de IL-4 e IL-5) e células Th9 (produtoras de IL-9 e IL-21). A IL-4 e IL-9 seriam responsáveis pela indução da produção de anticorpos pelos linfócitos B (IgG4 e IgE). A IL-5 seria responsável pela produção e ativação de eosinófilos. Além disso, a IL-4 poderia contribuir para a inibição da função de macrófagos ou para a diferenciação da ativação alternativa dos macrófagos (M2), levando à susceptibilidade a infecção. A produção de IL-27 nesse grupo de pacientes poderia estar relacionada à diferenciação de células Tr1 e a inibição da resposta Th17. A forma crônica/adulta apresenta uma resposta mista, com uma resposta predominante Th17 e Th22 (a última não se sabe ao certo se deriva diretamente de células T *naïve* ou se diferencia a partir de células Th17), mas com a contribuição das respostas Th1 e Th2/Th9. Nesse grupo, a presença de células iTreg poderia estar relacionada ao controle da resposta inflamatória, mas ao mesmo tempo contribuiria para a inibição da ativação dos macrófagos. Essa resposta mista se por um lado contribuiria para uma resistência parcial a infecção, por outro poderia induzir uma resposta inflamatória exacerbada, com ativação de neutrófilos, os quais podem levar ao dano tecidual, e posteriormente a fibrose frequentemente observada na maioria dos pacientes com essa forma da doença.

