VANESSA GOMES BATISTA

**EFEITO DE GLICOLIPÍDIOS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*
SOBRE A RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS CURADOS DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

VANESSA GOMES BATISTA

**EFEITO DE GLICOLIPÍDIOS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*
SOBRE A RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS CURADOS DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Gil Benard

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Batista, Vanessa Gomes.

Efeito de glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose / Vanessa Gomes Batista. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Modulação do sistema imune por glicolipídios.

Versão do título para o inglês: Effects of *Paracoccidioides brasiliensis* extracted glycolipids on innate and adaptative immune response of healthy cured paracoccidioidomycosis patients.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Glicolipídios 3. Sistema imune I. Prof. Dr. Benard, Gil II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB064/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Gomes Batista.

Título da Tese: Efeito de glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose.

Orientador(a): Prof. Dr. Gil Benard.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 26 de março de 2010.

PARECER 934 /CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 25.03.2010 **APROVOU** o projeto intitulado: *"Efeito de glicolipídios de Paracoccidioides brasiliensis sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose"* sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **GIL BENARD** e a aluna **VANESSA GOMES BATISTA**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.03.2011**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/12/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1048/07**, intitulado: "**EFEITO DE GLICOLÍPIDIOS DE PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS SOBRE A RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS CURADOS DE PARACOCCIDIODOMICOSE**" apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Gil Benard**

Pesquisador (a) Executante: **Vanessa Gomes Batista**

CAPPesq, 10 de Dezembro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa**

Dedico esta tese à minha família...
Eles que estão sempre ao meu lado,
mesmo que a muitos quilômetros de distância...
Ao meu porto seguro...

AGRADECIMENTOS

Sou grata a muitas pessoas que participaram da realização desta tese. São pessoas que me dedicaram seu tempo, seu conhecimento, sua paciência e sua confiança... e com isso contribuíram muito, de forma direta ou indireta, para a conclusão deste trabalho. Cito abaixo algumas pessoas especiais, ainda que com receio de que falte algum nome ou que eu não consiga expressar a magnitude da minha gratidão.

Ao Dr. Gil Benard, que me recebeu em sua equipe de pesquisa e depositou sua confiança em mim. Obrigada pela orientação e disponibilidade constante, por transmitir seu grande conhecimento nas áreas de paracoccidiodomicose e imunologia, por sua paciência e dedicação... não é qualquer orientador que vai de bom-humor até Pratânia para ajudar a coletar sangue de pacientes! Pelas palavras de incentivo: “capricha ai!” e por sua amizade.

Aos ex-pacientes do ambulatório de moléstias infecciosas que doaram sangue para essa pesquisa. Essas pessoas, já curadas há anos, não precisavam mais ir ao HC/FMUSP para qualquer tipo de acompanhamento e, mesmo assim, vinham muitas vezes de longe e com boa vontade para doar sangue para nosso trabalho. Se eu pudesse, citaria o nome dessas pessoas e agradeceria cada uma. Não menos importantes, meus agradecimentos a alguns moradores de áreas endêmicas que foram incomodados em suas casas e aos colegas do Instituto de Medicina Tropical que também nos doaram sangue para este trabalho.

Ao Dr. Marcos Toledo, amigo e pesquisador do laboratório de glico-conjugados da UNIFESP. Ele e todos em seu laboratório me acolheram com muito carinho (mesmo eu sendo da *outra* instituição! rs). Aprendi muito! Obrigada pela paciência em me ensinar, quase que do zero, a extração de lipídios e pela prontidão em me tirar dúvidas e ajudar em conceitos de química.

A Dra. Maria do Carmo Leite de Moraes, pela oportunidade de estágio no exterior e pelas contribuições científicas no estudo de células NKT. À Lucia Teixeira, pela colaboração e grande companheirismo durante este estágio.

À Dra. Cristina Crespo Rodrigues, pesquisadora que fez o levantamento de indivíduos reatores à paracoccidiodina na região de Pratânia – SP como parte de sua tese de doutorado. Obrigada por nos fornecer esses dados e pela colaboração na coleta de sangue desses indivíduos.

À Dra. Telma Oshiro, pelas contribuições científicas e sua disposição em ajudar sempre. Às queridas Noemia Orii, Rosangela Araújo e Soraya Oigusuku, não só pelo treinamento em citometria ou cultura de células, mas também pela amizade.

Às observações e sugestões dos professores da banca do exame de qualificação: Dra. Marcia Ribeiro Pinto da Silva, Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

À Dra. Maria J. S. Mendes-Giannini, Dr. Carlos Pelleschi Taborda e Thor Sessa pelo fornecimento de gp43 e de leveduras de *P. brasiliensis*, utilizados em diversos ensaios.

Ao Dr. Alberto José da Silva Duarte, chefe do laboratório de Investigação Médica 56, no qual este trabalho foi realizado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos.

Aos amigos: Adriana Ladeira, Camila Rodrigues Cacere, Cláudia Finazzo, Guilherme Gomes Silveira, Léia Cristina Rodrigues, Liã Arruda, Luciana Bento de Souza, Maria de Lourdes Palermo Neves, Mayce Azor, Paula Rigato, Susana Lessa... Todas essas pessoas dividiram comigo não apenas sua rotina de trabalho, mas se tornaram grandes amigas e até um irmão postiço! Cada um faz um pedacinho da minha história, me marcou de alguma forma, espero retribuir à altura a amizade vocês! Adoro todos vocês!

Um agradecimento especial a pessoas muito importantes para mim: meus pais, Giovani Batista e Maria do Carmo Gomes Batista, ambos o meu porto seguro. Pessoas corretas em tudo o que fazem e em quem tento sempre me espelhar! Sempre me apoiaram em qualquer decisão minha, por mais maluca... e até inconsequente que pudesse parecer... mas não era inconsequente pois eu sabia que vocês iam estar sempre

do meu lado caso algo saísse errado. Vocês são responsáveis por alavancar todas as minhas vitórias até hoje e fico feliz em ver que estou conseguindo deixá-los orgulhosos. Aos meus irmãos Giovanni e Felipe, pela cumplicidade, companheirismo. A Rene Silveira por fazer parte da minha vida. Por fim, agradeço a Deus por me colocar no lugar certo, na hora certa e me permitir conviver com todas essas pessoas citadas, por todos os momentos de sorte, de intuição e inspiração.

*“Tua caminhada ainda não terminou....
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.*

*Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.*

*É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.*

*Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita
é quase chegar a perfeição.
A juventude precisa de sonhos
e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios
precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.*

*Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”*

Charles Chaplin

RESUMO

BATISTA, V. G. **Efeito de glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose.** 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Glicosíngolipídios (GSLs) são importantes componentes estruturais das membranas de células eucarióticas. Nos fungos, essas moléculas participam de processos como germinação de esporos, proliferação e alteração de morfologia. Quando adicionados a culturas de células, certos GSLs podem se inserir em regiões específicas das membranas celulares, os *lipid rafts*, e com isso modular a funcionalidade das células. *In vivo*, esses GSLs poderiam representar um mecanismo de escape em infecções por fungos, ou então desencadear ou potencializar uma resposta imune contra eles. Neste trabalho avaliamos se GSLs de *Paracoccidioides brasiliensis* possuem atividade imuno-moduladora em células de indivíduos saudáveis com ou sem histórico de paracoccidioidomicose (PCM). Foram testados glucosilceramida (CMH) e glicoinositolfosfoceramida (GIPC), extraídos de leveduras da cepa Pb-18. Os grupos experimentais consistiram de um grupo controle, contendo 20 indivíduos de ambos os sexos, sem histórico de PCM; e um grupo de indivíduos curados, ou seja, indivíduos saudáveis, mas que demonstraram susceptibilidade a PCM. No grupo controle, CMH elevou a linfoproliferação em culturas com fitohemaglutinina (PHA) de forma dose dependente, com efeito máximo na concentração de 50 μ M, porém sem efeitos em cultura com antígeno de *Candida albicans* (CMA) ou alteração do perfil de secreção de citocinas. Por outro lado, no grupo curado CMH não alterou linfoproliferação com PHA, porém apresentou um caráter inibitório em culturas com CMA e gp43, o componente imunodominante secretado por *P. brasiliensis*. Houve ainda uma queda na produção de citocinas de perfil Th1, IL-2 e IFN- γ . Essa discrepância entre os grupos pode ter ocorrido devido à produção elevada de IL-10 por células apresentadoras de antígenos do grupo curado. CMH foi também capaz de elevar a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em monócitos, porém reduziu a capacidade de células dendríticas em induzir proliferação de linfócitos. No grupo curado, CMH reduziu a produção de IL-10 por células dendríticas maduras e aumentou a produção de IL-12p40, sugerindo um viés para indução de células Th1. GIPC apresentou efeitos distintos de CMH. A resposta proliferativa de linfócitos não foi alterada por esse GSL, porém houve diferenciação

favorável para células Th1 no grupo controle, fato que não ocorreu no grupo curado. GIPC ainda foi capaz de elevar a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, exclusivamente no grupo controle, porém reduziu fortemente a maturação de células dendríticas e sua capacidade de induzir linfoproliferação. A funcionalidade de células iNKT de indivíduos controles e susceptíveis também foi avaliada neste trabalho. Para este estudo, foi incluído um terceiro grupo de indivíduos moradores de zona endêmica, com teste cutâneo para paracoccidiodina positivo. Não houve diferença no número de células, na capacidade de expansão e na produção das principais citocinas produzidas por essas células entre os grupos. Em conclusão, demonstramos que GSLs de *P. brasiliensis* são capazes de alterar a funcionalidade de diferentes células do sistema imune. Houve diferença na resposta a estes GSLs por indivíduos controles e susceptíveis, demonstrando a necessidade de se elucidar os mecanismos de ação dos GSLs e as alterações potencialmente associadas à susceptibilidade ou resistência à PCM.

Palavras- chave: Glicosfingolipídios. *Paracoccidioides brasiliensis*. Sistema imune.

ABSTRACT

BATISTA, V.G. **Effects of *Paracoccidioides brasiliensis* extracted glycolipids on innate and adaptative immune response of healthy cured paracoccidioidomycosis patients.** 2012. 157 p. Ph.D. Thesis (Imunology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Glycosphingolipids (GSL) are important structural compounds of membranes in eukaryote cells. In fungi, these molecules are involved in spores germination, growth and morphology change. When added in cellular culture, some GSL may insert into specific membrane regions, called lipid rafts. As result, they modulate cellular function. *In vivo*, GSLs could represent scape mechanisms from immune responses or, in the other hand, could trigger or improve host immune reaction. In this work we evaluated whether GSL extracted from *Paracoccidioides brasiliensis* are able to modulate immune cells of healthy cured paracoccidioidomycosis (PCM) patients or individuals who never had PCM. Two GSL, glucosylceramide (CMH) and glycoinositol-phosphoceramide (GIPC) were extracted from *P. brasiliensis* yeast cells. Two experimental groups were enrolled in this study: control group – composed of 20 healthy individuals of both sexes, who never had PCM; and cured group – composed of 15 healthy individuals who have had PCM in the past but are cured for over 10 years, whose represent susceptible individuals. In control group, CMH increased, in a dose-dependent manner, lymph-proliferation in cultures stimulated with phytohemagglutinin (PHA). Maximum effect was observed with 50 μ M. No modulation occurred when peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with *Candida albicans* metabolic antigen (CMA). In cured groups, CMH had no effect on PHA-stimulated lymphocyte proliferation, however, CMH decreased gp43 and CMA- induced lymph - proliferative response. Also, there was a decreased in IL-2 and IFN- γ production, which in turn may have occurred due to an increased IL-10 secretion by monocytes and dendritic cells observed in cured group. In both groups CMH increased CD80 and CD86 expression by monocytes. In the other hand, this GSL reduced lymphocyte proliferation response to co-cultured dendritic cells. CMH was able to reduce IL-10 and increase IL-12 p40 secretion by mature dendritic cells of cured group, suggesting a Th1 bias. The other GSL analyzed, GIPC, had no effects on lymphocyte proliferation, although it increased Th1 cytokines secretion. GIPC added to monocytes culture increased phagocytic capacity, exclusively on control group. Maturation of dendritic cells, mostly

of control group were diminished by this GSL, associated to a decrease in the dendritic cell capacity to induce lymph-proliferation. iNKT cells were also analyzed. A third experimental group, composed of five endemic areas living-individuals with no PCM history, was evaluated. There were no differences in iNKT cells number, expansion capacity and IL-10, IL-4 and IFN- γ production among the three groups. In conclusion, GSL extracted from *P. brasiliensis* are able to modulate immune cells functions. Control and cured groups responded distinctly to CMH and GIPC in many assays. These results demonstrate the necessity of to clarify the GSL mechanisms of action and to understand the mechanisms conferring resistance or susceptibility to PCM.

Keywords: Glycosphingolipids. *Paracoccidioides brasiliensis*. Immune system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -GalCer: α -Galactosilceramida
AcNa: acetato de sódio
APC: célula apresentadora de antígeno
B: condição basal, células cultivadas apenas em meio de cultura.
BSA: soro-albumina bovina
C: clorofórmio
CFSE: carboxifluoresceína diacetato succinil éster.
CFU: unidades formadoras de colônia
CLR: receptores de lectina do tipo C
CMA: antígeno metabólico de *Candida albicans*
CMH: monohexosilceramida
CNS: Conselho Nacional de Saúde
cpm: contagem de emissões β por minuto
DCm: células dendríticas maduras
DCi: células dendríticas imaturas
DEAE: dietilaminoetil
DMSO: dimetilsulfóxido
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
ERK: *extracellular signal- regulated kinase*
gp43: glicoproteína de 43KDa
GPI: glicosilfosfatidilinositol
GM1: monosialotetrahexosil-gangliosídeo
GIPC: glicoinositolfosfoceramida
GSL: glicosfingolipídios
H: hexano
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HC-FMUSP: Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina – USP
HLA-DR: *human leukocyte antigen* – haplótipo DR.
HPTLC: cromatografia em camada delgada de alto desempenho
ICB: Instituto de Ciências Biomédicas - USP
iGB3: isoglobotrihexosilceramida
iMFI: Intensidade média de fluorescência integrada

IPA: isopropanol

IPC: inositolfosfoceramida

IMT: Instituto de Medicina Tropical - USP

JNK: c-Jun N-terminal quinase

LPS: lipopolissacarídeo

M: metanol

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

NFAT: fator nuclear de células T ativadas.

NF-κB: Fator nuclear κB

NIH: National Institute of Health, EUA

NK: célula *natural killer*

NO: óxido nítrico

OCH: [(2*S*, 3*S*, 4*R*) – 1 – *O* - (α – D - galactopyranosyl) – *N* – tetracosanoyl – 2 amino-1,3,4-nonanetriol]

PAMPs: padrão molecular associado a patógenos

PBS: tampão fosfato-salina

PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

PCC+: teste cutâneo para paracoccidíose positivo

PCM: paracoccidíose

PGY: Peptona / glucose / levedura – meio de cultura para cultivo de *P. brasiliensis*

PHA: fitohemaglutinina

PKC: proteína quinase C

PMA: *phorbol myristate acetate*

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões moleculares

rpm: rotações por minuto

SAB: soro AB

TLR: receptor Toll-like

TMB: tetrametilbenzidina

TCR: receptor de célula T

W: água (water)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de <i>P. brasiliensis</i> :	26
Figura 2 - Representação esquemática de uma molécula de GSL	36
Figura 3 - Representação da molécula de CMH de <i>P. brasiliensis</i>	39
Figura 4 - Representação da molécula de GIPC de <i>P. brasiliensis</i>	40
Figura 5 - Purificação de GSLs de <i>P. brasiliensis</i>	47
Figura 6 - Isolamento de monócitos por beads magnéticas acopladas a anti-CD14	50
Figura 7 - Viabilidade de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de CMH.	57
Figura 8 - Linfoproliferação em PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de CMH.	58
Figura 9 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA ou CMA, na presença de CMH - Grupo controle.	59
Figura 10 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de CMH - Grupo controle.	60
Figura 11 - Dosagem de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA, na presença de CMH – Grupo controle.	61
Figura 12 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA, CMA ou gp43, na presença de CMH – Grupo curado.	62
Figura 13 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de CMH – Grupo curado.	63
Figura 14 - Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA ou gp43, na presença de CMH – Grupo curado.	64
Figura 15 - Expressão de CD80 e CD86 em monócitos cultivados com CMH – Grupo controle.	65
Figura 16 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e CD40 em monócitos cultivados com CMH – Grupo controle.	66
Figura 17 - Expressão de CD80 e CD86 em monócitos cultivados com CMH – Grupo curado	67
Figura 18 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e CD40 em monócitos cultivados com CMH – Grupo curado.	68

Figura 19 - Histograma demonstrativo da expressão de CD80 e CD86 em monócitos _____	.69
Figura 20 - Dosagem de TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de cultura de monócitos cultivados com CMH. _____	71
Figura 21 - Estratégia de análise de fagocitose por citometria de fluxo. _____	72
Figura 22 - Avaliação da capacidade de fagocitose por monócitos previamente incubados com CMH. _____	73
Figura 23 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH – Grupo controle. _____	74
Figura 24 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH – Grupo curado. _____	75
Figura 25 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de CMH – Grupo controle. _____	77
Figura 26 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de CMH – Grupo curado. _____	78
Figura 27 - Linfoproliferação em co-culturas de linfócitos e células dendríticas maturadas na presença de CMH – Grupo controle. _____	79
Figura 28 - Linfoproliferação em co-cultivos de células dendríticas maturadas na presença de CMH e linfócitos autólogos – Grupo curado. _____	80
Figura 29 - Viabilidade de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de GIPC. _____	82
Figura 30 - Linfoproliferação em PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de GIPC. _____	83
Figura 31 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA ou CMA, na presença de GIPC - Grupo controle. _____	84
Figura 32 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA, CMA ou gp43, na presença de GIPC – Grupo curado _____	85
Figura 33 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ o sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de GIPC - Grupo controle. _____	86
Figura 34 - Dosagem de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA, na presença de GIPC – Grupo controle. _____	87
Figura 35 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de GIPC – Grupo curado. _____	88

Figura 36 - Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA ou gp43, na presença de GIPC – Grupo curado. _____	89
Figura 37 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e moléculas co-estimuladoras em monócitos cultivados com GIPC – Grupo controle. _____	90
Figura 38 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e moléculas co-estimuladoras em monócitos cultivados com GIPC – Grupo curado. _____	91
Figura 39 - Dosagem de TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de cultura de monócitos cultivados com GIPC. _____	93
Figura 40 - Avaliação da capacidade de fagocitose por monócitos previamente incubados com GIPC. _____	94
Figura 41 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH – Grupo controle. _____	95
Figura 42 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH – Grupo curado. _____	96
Figura 43 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo controle. _____	98
Figura 44 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo curado. _____	99
Figura 45 - Linfoproliferação em co-culturas de linfócitos e células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo controle. _____	100
Figura 46 - Linfoproliferação em co-culturas de linfócitos e células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo curado. _____	101
Figura 47 - Porcentagem inicial e expansão de células iNKT _____	104
Figura 48 - Estratégia de análise das células iNKT _____	105
Figura 49 - Produção de citocinas por células iNKT ex-vivo _____	106
Figura 50 - Produção de citocinas por células iNKT pós- expansão com α -GalCer _____	107
Figura 51 - Produção de citocinas após ativação com α -GalCer por 6 horas _____	108
Figura 52 - Expansão de células iNKT com OCH e iGB3 _____	109
Figura 53 - Produção de citocinas pós-expansão de células iNKT com OCH _____	110
Figura 54 - Produção de citocinas pós-expansão de células iNKT com iGB3 _____	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de indivíduos incluídos no estudo. _____	44
Tabela 2 - Intensidade média de fluorescência integrada (iMFI) de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em monócitos cultivados com CMH. _____	70
Tabela 3 - iMFI de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH. _____	76
Tabela 4 - iMFI de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígenos e PRRs em monócitos cultivados com GIPC por 24 horas. _____	92
Tabela 5 - iMFI de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com GIPC. _____	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Paracoccidioidomicose	24
1.2 Resposta imune na paracoccidioidomicose	27
1.3 Células iNKT	34
1.4 Glicosfingolípídios de <i>P. brasiliensis</i>:	36
2 OBJETIVOS	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS:	43
3.1 Casuística	43
3.2 Obtenção de GSLs de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>:	44
3.2.1 Extração de GSLs do <i>P. brasiliensis</i> :	44
3.2.2. Separação das frações neutras e ácidas dos GSLs:	45
3.2.3. Purificação das frações ácidas e neutras dos GSLs:	46
3.2.4 Dosagem dos GSL:	48
3.3 Antígeno gp43	48
3.4 Proliferação de linfócitos em cultura de PBMC na presença dos GSLs:	48
3.5 Cultura de monócitos com GSLs.	49
3.6 Avaliação de fagocitose de <i>P. brasiliensis</i> por monócitos:	52
3.7 Cultura de células dendríticas com GSLs	52
3.8 Ensaio de co-cultivo de células dendríticas cultivadas com GSLs e linfócitos autólogos:	53
3.9 Dosagem de citocinas em sobrenadante de culturas contendo GSLs	54
3.10 Cultura de células iNKT	55
4 RESULTADOS	57
4.1 Resultados com CMH extraído de <i>P. brasiliensis</i>:	57
4.2 Resultados com GIPC extraído de <i>P. brasiliensis</i>	82
4.3 Resultados com células iNKT	103
5 DISCUSSÃO	112
6 CONCLUSÃO	126
REFERÊNCIAS	128

ANEXOS	145
ANEXO A: Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido.	146
ANEXO B: Artigo publicado	150

1 INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Mesmo após 100 anos da sua descoberta, apresenta a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil, correspondendo a 44,6% das causas de morte entre essas micoses. Diferentemente de outras micoses como candidíase, criptococose ou aspergilose, que são associadas a pacientes imunodeprimidos, a PCM é rara nestes indivíduos e acomete principalmente indivíduos imunocompetentes (PRADO et al., 2009). Por não ser uma doença de notificação compulsória, não é possível afirmar com exatidão a incidência de novos casos, porém, estima-se que a taxa anual varie de 0,3 a 3 novos casos em cada 100.000 habitantes em áreas endêmicas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) e não existem ainda medidas conhecidas para se evitar a infecção. No Brasil essas áreas endêmicas correspondem principalmente às regiões sudeste e centro-oeste e se estendem para países como Argentina, Colômbia e Venezuela (WANKE; AIDÊ, 2009), entre outros da América Latina.

A ecologia de *P. brasiliensis* ainda não está totalmente definida, mas várias evidências sugerem fortemente que seu habitat seja o solo (RESTREPO, 1985). Existe também certa conexão entre condições climáticas específicas e a prevalência da infecção. O desenvolvimento do fungo não é determinado diretamente pelo tipo de solo, arenoso ou argiloso. Entretanto solos argilosos possuem uma maior capacidade de reter água. A umidade, tanto do solo quanto do ar, é um fator determinante para o desenvolvimento do fungo (BARROZO et al., 2009; TERÇARIOLI et al., 2007). O aumento da umidade do ar pode facilitar a liberação de esporos do fungo, e no solo pode facilitar o crescimento de *P. brasiliensis*, que provavelmente habita abaixo da superfície, pois a detecção do fungo por biologia molecular ocorreu apenas em amostras coletadas de buracos deixados por tatus e não de solo coletado da superfície (TERÇARIOLI et al., 2007). O manuseio da terra por trabalhadores agrícolas e atividades correlatas exporia o fungo e possibilitaria a infecção, que ocorre pela inalação de esporos. A espécie de tatu *Dasypus novemcinctus* é o animal considerado

como um marcador de áreas de risco, por ser um animal que se desenvolve nas mesmas áreas consideradas endêmicas para o *P. brasiliensis* e por vários estudos terem mostrado a infecção pelo fungo nesses animais (FERNANDES et al., 2004; RICHINI-PEREIRA et al., 2008; SILVA-VERGARA; MARTINEZ, 1999). Entretanto, seu papel como reservatório natural do microorganismo não é comprovado. Recentemente vem sendo demonstrados casos de infecção pelo fungo em diversos outros animais selvagens ou aqueles cujo habitat é relacionado com o solo, como cães (ONO et al., 2001), cavalos (CORTE et al., 2005a), bovinos (SILVEIRA et al., 2005), macacos (CORTE et al., 2005b), cobaia, porco-espinho e guaxinins (RICHINI-PEREIRA et al., 2008) demonstrando que não só tatus, mas uma grande variedade de mamíferos pode ser infectada por *P. brasiliensis*.

Paracoccidioides brasiliensis pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae. Possui a característica de ser termo-dimórfico, ou seja, sua morfologia varia de acordo com a temperatura. Quando à temperatura ambiente, o fungo encontra-se na forma de micélio, com hifas hialinas, finas e septadas (figura 1a). Nesta forma, a membrana celular é composta por 36 - 47% de glucanas, 7 - 18% de quitina (polímero de glucosamina), 24 - 41% de proteínas e 5 - 10% de lipídios (KANETSUNA et al., 1969). Entretanto, com a mudança de temperatura para 35 – 37 °C ocorrem mudanças na composição da membrana do fungo, alteração de sua rigidez e sua morfologia, para leveduriforme. Nesta fase, a composição da membrana passa para 36 - 47% de glucanas, 37- 48% de quitina, 7 - 14% de proteínas e 5 - 10% de lipídios (KANETSUNA et al., 1969). As leveduras apresentam múltiplos brotamentos característicos de *P. brasiliensis* (figura 1b), lembrando a forma de timão (LACAZ, 1994).

Figura 1 - Morfologia de *P. brasiliensis*:

Morfologias possíveis de *P. brasiliensis*. A) Forma filamentosa do fungo, à temperatura ambiente; B) brotamentos na forma de levedura, a 37 °C.

FONTE: Figura adaptada de Broad Institute (2012).

A infecção humana ocorre pela inalação dos propágulos (conídios) liberados de *P. brasiliensis* na sua fase miceliana (forma infectante), os quais invadem as vias aéreas, alvéolos e bronquíolos terminais, transformando-se em levedura (RESTREPO, 1985), sua forma patogênica. Indivíduos do sexo masculino são os mais afetados (1 mulher : 10-15 homens). Entretanto essa diferença de prevalência não existe em indivíduos com idade inferior a 14 anos, devido provavelmente a um efeito protetor do hormônio feminino estrogênio, o qual inibe a transformação do fungo da forma de conídio para levedura (ARISTIZABAL et al., 1998; LOOSE et al., 1983; SALAZAR, RESTREPO, STEVENS, 1988). Como a infecção normalmente atinge os indivíduos nas idades mais produtivas, a PCM acaba tendo um importante impacto social. O tratamento com drogas antifúngicas (geralmente itraconazol ou uma combinação de sulfametazol e trimetropim) é longo, em média de 6 meses a 2 anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) e podem ainda permanecer sequelas nos órgãos comprometidos, como má absorção intestinal, estenose de laringe, disfunção das glândulas adrenais, fibrose pulmonar e/ou epilepsia, entre outros (LONDERO, 1986).

As manifestações clínicas da doença podem ser uma forma aguda / sub-aguda (juvenil); ou crônica (adultos). A **doença aguda** corresponde a 3 - 5% dos casos em que há manifestações clínicas e ocorre principalmente em crianças, adolescentes e adultos com menos de 30 anos. Nestes casos, o fungo inalado se dissemina a partir dos pulmões através do sistema monocítico-fagocitário e se estabelece em gânglios linfáticos, fígado

e baço, causando esplenomegalias e crescimento de gânglios. Os sintomas podem incluir febre, manifestações cutâneas, perda de peso, dor abdominal, compressão de intestino ou ductos biliares, vômito, diarreia, entre outros. Nestes casos o envolvimento pulmonar é raro (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Por sua vez, a **doença crônica** é a de maior prevalência, correspondendo a mais de 90% dos casos de doença. Nestes casos o fungo permanece quiescente e após um longo período de tempo, anos ou décadas, ocorre reativação do foco inicial, progredindo para uma infecção de caráter granulomatoso ou fibrótico, que acomete pulmões e mucosas da via respiratória, oral, de faringe, laringe e pulmonar (FRANCO, 1987). Os sintomas geralmente são um histórico de tosse com duração de vários meses, perda de peso, anorexia devido à dificuldade em engolir os alimentos e em alguns casos, comprometimento das glândulas adrenais. Tais manifestações clínicas são condicionadas a fatores relacionados ao fungo (virulência, patogenicidade e composição antigênica) e ao hospedeiro (suscetibilidade genética, faixa etária, tabagismo, etilismo, desnutrição e deficiência do sistema imunológico) (LONDERO, 1982).

1.2 Resposta imune na paracoccidioidomicose

Grande parte dos fungos é capaz de alterar sua estrutura e metabolismo para sobreviver ao ambiente em que estão alocados. Essas alterações incluem modificações na composição de suas membranas, troca de morfologia e têm como finalidade adquirir nutrientes, estabelecer uma relação simbiótica, comensal, latente ou patogênica ou ainda, escapar de uma resposta imune desencadeada num hospedeiro (ROMANI, 2011). Mesmo com essa habilidade de se camuflar, o sistema imune é capaz de reconhecer a presença do patógeno e desencadear respostas imunes que impedem ou limitam o crescimento fúngico. Por outro lado, também é necessário que o dano tecidual causado pelas respostas imunes geradas seja minimizado. Assim, um balanço fino entre sinais anti e pró-inflamatórios é necessário para manter a relação fungo-hospedeiro e um desbalanço nessa relação pode acarretar consequências patológicas.

A primeira linha de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis* ocorre nos pulmões, sítio de entrada do patógeno, por macrófagos alveolares (FRANCO, 1987, BRUMMER, 1994) e demais componentes da imunidade inata, tais como defensinas e

outras proteínas secretadas pelo epitélio pulmonar (CALICH et al., 2008). As células do sistema imune detectam a presença de um micro-organismo pela ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - do inglês: *pathogen associated molecular patterns*) (BARTON; MEDZITOV, 2002; GORDON, 2002) a diversos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês: *pattern recognition receptors*) presentes nas células do hospedeiro. Pela ativação de PRRs, macrófagos pulmonares reconhecem *P. brasiliensis*, levando à fagocitose e geração de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em modelo animal (BRUMMER et al., 1989; GONZALEZ et al., 2000; MOREIRA et al., 2008) e principalmente H₂O₂ em células humanas (CARMO et al., 2006), importantes para a lise do fungo. A fagocitose do fungo nem sempre é suficiente para o controle da infecção, uma vez que sem a ativação adequada e a geração de moléculas microbicidas suficientes, o fungo permanece viável no interior da célula hospedeira (BRUMMER et al., 1989, MOSCARDI-BACCHI; BRUMMER; STEVENS, 1994) e esta passa a ser um reservatório e disseminador da infecção para outros sítios. A complexidade da resposta imune contra *P. brasiliensis* é evidenciada pelo fato de que, paradoxalmente, macrófagos alveolares de modelos animais susceptíveis à PCM (camundongos B10.A) apresentam uma maior produção de NO e IL-12 e são mais competentes em controlar a infecção inicial do que animais resistentes (camundongos A/J), que produzem baixas concentrações desse metabólito e TGF- β em maior concentração. Esse padrão parece ser revertido somente quando passa a haver a ação concomitante do sistema imune adaptativo, com secreção de IL-2 e IFN- γ . Dessa forma os macrófagos pulmonares dos animais resistentes adquirem capacidade fungicida enquanto que as altas concentrações de NO produzidas pelos animais susceptíveis poderiam posteriormente atuar como inibidores da função de células T nesses animais (PINA; BERNARDINO; CALICH, 2008).

Os principais componentes encontrados nas membranas dos fungos são as β -glucanas, (polímeros de glucose ligados entre si por ligações do tipo β); quitina (polímeros de N-acetilglucosamina) e mananas (cadeias de manose). Esses polissacarídeos estruturais da parede celular fúngica são altamente conservados entre os fungos e críticos para seu crescimento e desenvolvimento, sendo assim PAMPs ideais. Durante uma infecção fúngica, diversos PRRs podem ser ativados simultaneamente e a resposta imune final vai depender do grau de ativação relativo de cada receptor, do tipo celular, da espécie de fungo, de seus componentes estruturais, rota de infecção e a

cooperação com outros receptores. Existem diferentes tipos de PRRs, tais como receptores semelhantes a Toll (TLR- do inglês *Toll-like receptors*) e receptores de lectinas do tipo C (CLR- do inglês *C-type lectin receptors*). TLRs são uma família de receptores que reconhecem padrões moleculares, como lipopolissacarídeo (LPS), flagelina, RNA de dupla-fita, compostos por lipoproteínas e lipopeptídeos presentes numa variedade de patógenos (TAKEDA; KAISHOL; AKIRAL, 2003). TLR-2 e TLR-4 são os principais TLRs de superfície envolvidos no reconhecimento de componentes fúngicos (zymosan e mananas) e estão envolvidos na resposta imune contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis jirovecii* (ROEDER et al., 2004). Quanto ao fungo *P. brasiliensis*, foi observado em modelo animal uma expressão elevada de receptores TLR-2 em células dendríticas e monócitos em camundongos susceptíveis (B10.A), associada à produção de IL-10 e TNF- α , o que potencialmente contribuiria como mecanismo de escape do fungo à resposta imune do hospedeiro. Por outro lado em camundongos resistentes (A/J) a expressão de TLR-2 era reduzida, assim como a produção dessas citocinas (FERREIRA et al., 2007). O reconhecimento do *P. brasiliensis* por TLR-2 e TLR-4 causa aumento da fagocitose, entretanto sem alterar a morte dos fungos fagocitados. Estes dados sugerem que o reconhecimento por TLR-2 e TLR-4 possa representar um mecanismo de escape do fungo, aumentando sua sobrevivência e multiplicação no interior dos monócitos (CALICH et al., 2008). Sabe-se que a adição de *P. brasiliensis* a culturas de monócitos ou neutrófilos de indivíduos normais é capaz de reduzir a expressão de TLR-1, TLR-2 e TLR-4 e esse efeito seria resultado do reconhecimento e internalização do complexo PAMP - PRR (BONFIM; MAMONI; BLOTA, 2009). Já os CLR reconhecem resíduos de carboidratos e são essenciais para o reconhecimento de fungos e o desencadeamento de resposta imune. Nesta família estão presentes os receptores delectina. A delectina-1 é o principal receptor para β 1-6 glucanas e sua ligação ativa a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Já foi demonstrada a participação dos receptores do tipo delectina no reconhecimento de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides sp*, *Microsporium sp* e *Trycophyton sp* (BROWN, 2006). Um dos mecanismos de evasão de fungos como *P. brasiliensis* seria mascarar ligações β 1-6 em glucanas, presentes nas hifas, alterando para β 1-3 glucanas nas leveduras (KANETSUNA; CARBONELL, 1970). Estimulação de monócitos por *P. brasiliensis* da cepa Pb18 levou a uma redução na expressão de delectina-1 e a cepa Pb256, que contém uma maior concentração

de β -glucanas, causou uma redução ainda maior (BONFIM; MAMONI; BLOTA, 2009) sugerindo que ocorra ligação a este receptor, pois estes também são internalizados após ativação (BROWN et al., 2002). Sugere-se que a cepa Pb18 seja mais virulenta por possuir mais ligações do tipo α -glucana, que esconderia as ligações β -glucana, diminuindo assim o reconhecimento pelos receptores dectina-1 (SILVA; ALVES; FIGUEIREDO, 1994).

Outro componente da imunidade inata que pode detectar a presença de micro-organismos são as proteínas do sistema complemento. Foi demonstrado que *P. brasiliensis* é capaz de ativar a via das lectinas em camundongos, porém isso ocorre principalmente nas cepas menos virulentas (TOLEDO, R.G. et al., 2010). A ativação da via alternativa não resulta em aumento de ação fungicida ou da viabilidade fúngica, mas pode contribuir para a formação de edema, opsonização e fagocitose por macrófagos (CALICH et al., 1979; CALICH; BURGER; VAZ, 1985). Em humanos, foi demonstrado que mesmo ocorrendo ativação do sistema complemento por leveduras de *P. brasiliensis* esta não é capaz de causar lise das células fúngicas (MUNK et al., 1992), mas é capaz de causar quimiotaxia de neutrófilos para os locais de infecção (CROTT et al., 1993). Quanto à participação dessas células na imunidade contra *P. brasiliensis*, os dados obtidos até hoje ainda são controversos. Embora alguns autores afirmem que as leveduras de *P. brasiliensis* não são mortas por neutrófilos humanos ou em modelos animais (KURITA et al., 1999^a, 1999^b), outros demonstram que neutrófilos humanos são capazes de fagocitar e matar o fungo através da geração de metabólitos derivados do oxigênio (BRUMMER et al., 1989; DIAS; FILGUEIRA; SOUZA, 2004; McEWEN et al., 1987).

Um tipo celular com papel importante na defesa contra a infecção por *P. brasiliensis* são as células dendríticas. Embora os macrófagos possam desempenhar um papel de célula apresentadora de antígeno (APC), são as células dendríticas as células consideradas profissionais nessa função. A partir da ligação do receptor de células T (TCR) a antígenos apresentados pelas APCs, dispara-se o primeiro sinal que culmina no direcionamento do sistema imune adaptativo em favor de Th1 ou Th2 e na expansão clonal. Além disso, é necessária a presença de um segundo sinal, provido pelas moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 que se ligam às moléculas CD28 e CD40L nos linfócitos. Um terceiro sinal seria gerado por citocinas presentes no micro-ambiente, sendo que essa polarização é criticamente dependente de IL-12, IL-4

(SCOTT, 1993) ou IFN- γ (ABDI; SINGH; MATZINGER, 2006). Na PCM, foi demonstrada uma maior participação de linfócitos B como célula apresentadora do antígeno gp43 (glicoproteína de 43 kDa secretada por *P. brasiliensis* e considerada seu antígeno imunodominante) em camundongos susceptíveis (B10), com forte ativação da subpopulação Th2; e inversamente, uma maior participação de macrófagos em animais resistentes (A/Sn), e secreção de citocinas de perfil Th1 (ALMEIDA et al., 1998; FERREIRA; LOPES; ALMEIDA, 2003). Células dendríticas de animais resistentes apresentaram uma maior efetividade na apresentação de antígenos por essas células em camundongos resistentes que animais susceptíveis, avaliado por ensaios de proliferação celular em co-cultura de células dendríticas pulsadas com gp43 e linfócitos T (ALMEIDA; LOPES, 2001). *P. brasiliensis* fagocitados foram ainda capazes de reduzir a expressão de MHC-II em células dendríticas imaturas e limitar o aumento da expressão de MHC-II, CD86, CD80 e CD40 que ocorreria após a maturação dessas células, demonstrando uma apresentação de antígeno prejudicada (FERREIRA; LOPES; ALMEIDA, 2004; FERREIRA; ALMEIDA, 2006). Em humanos existem poucos trabalhos envolvendo *P. brasiliensis* e células apresentadoras de antígenos, mas há evidências de que pacientes com PCM apresentam uma redução na fagocitose de gp43 e na expressão de moléculas de superfície (BAIDA, 2007).

Trabalhos sobre atividade citotóxica direta sobre células infectadas por *P. brasiliensis* são raros. Um trabalho em camundongos demonstrou a importância de células T CD8+ no controle da infecção, uma vez que a depleção dessas células com anticorpos anti-CD8 causa formas mais graves e disseminadas da doença, mesmo em animais resistentes (CANO et al., 2000). Em humanos estas células estão presentes em granulomas de lesões cutâneas e em mucosas, expressando granzima B e perforina (PAGLIARI; PEREIRA; KANASHIRO, 2010), porém em pacientes com a forma ativa da doença as células *natural killer* (NK) circulantes apresentam uma baixa expressão de grânulos citotóxicos e menor grau de ativação em comparação a indivíduos infectados sem sintomas (BURLANDY – SOARES et al., 2010). O papel das células NK também não foi ainda completamente explorado. Peraçoli et al. (1991) encontraram um aumento no número de células NK circulantes em pacientes com PCM, entretanto, estas apresentavam uma atividade citotóxica reduzida. Em hamsters, o aumento de células NK está relacionado a uma depressão da resposta imune e aumento das lesões nas fases mais tardias da infecção (PERAÇOLI et al., 1995).

A imunidade celular é a grande responsável pela resistência à infecção pelo fungo (BENARD, 2008; CALICH et al., 2008; MUSATTI et al., 1976). A resposta imune adaptativa na PCM, observada em animais ou indivíduos resistentes, é basicamente do tipo Th1, com uma grande participação do sistema monocítico-fagocitário. A imunidade humoral parece ter pouca participação no controle da infecção, embora altos títulos de anticorpos específicos sejam encontrados em casos graves (FRANCO et al., 1989). Culturas de células mononucleares sanguíneas (PBMCs) de pacientes com a forma ativa da doença na presença de gp43 apresentam níveis reduzidos de IL-2 e IFN- γ (BENARD et al., 2001; KARHAWI; COLOMBO; SALOMÃO, 2000) e IL-12 (ROMANO et al., 2002, 2005), acompanhado por um aumento de IL-10 (CAMARGO et al., 1991; MAMONI, BLOTTA, 2005; MENDES-GIANNINI et al., 1990). Corroborando com o aumento de IL-10, observou-se um aumento de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ no sangue periférico e também nos infiltrados pulmonares, ao redor dos granulomas, de pacientes com a forma ativa da doença (FERREIRA et al., 2010). Adicionalmente, citocinas indicativas de padrão Th-2, como IL-4 e IL-5 encontram-se aumentadas em pacientes com a forma aguda (OLIVEIRA et al., 2002) e crônica (MELLO; SILVA-VERGARA; RODRIGUES, 2002). Quanto às citocinas da imunidade inata, Peraçoli et al. (2003) observaram um aumento da produção de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- β por monócitos de pacientes com a forma ativa, na ausência de estímulo, porém, após estimulação com LPS, a produção de IL-6 e TNF- α foi inferior à de indivíduos saudáveis e a de IL-1 β , IL-10 foi superior nestes indivíduos, sugerindo um desbalanço na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Já em indivíduos sensibilizados, porém sem histórico da doença, foram encontrados baixos níveis de IL-10 e altos de IFN- γ (OLIVEIRA et al., 2002; ROMANO et al., 2005). Esse perfil de citocinas também é encontrado em modelos animais. Camundongos susceptíveis (B10.A) infectados com *P. brasiliensis* apresentam uma produção preferencial de IL-4, IL-5 e IL-10, altos níveis de TGF- β , baixos de TNF- α e uma produção transiente de IL-2. Já os animais resistentes apresentam uma maior produção de IFN- γ (CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2003), alta produção de TNF- α , uma produção sustentada de IL-2 e baixa produção de TGF- β (CALICH; KASHINO, 1998). A redução da produção de citocinas Th1 vem acompanhada de diminuição da resposta proliferativa aos antígenos

de *P. brasiliensis*, *Candida albicans* e ao mitógeno fitohemaglutinina (PHA) em vários pacientes quando comparados com indivíduos sadios sensibilizados ao fungo (BENARD et al., 1996; MUSATTI et al., 1976), demonstrando uma imunossupressão celular, predominantemente antígeno-específica e também inespecífica nas formas mais graves da doença. Nestes casos ainda observam-se outros mecanismos associados com a baixa resposta ao fungo, tais como anergia ou apoptose de células T (CACERE et al., 2002; CAMPANELLI et al., 2003).

As citocinas IFN- γ e IL-4 são críticas para a polarização dos linfócitos T naive para células com perfil Th1 ou Th2. IFN- γ ou células T previamente ativadas, mas não células T naive, participam do direcionamento para uma produção de IL-12 p70 por células dendríticas (ABDI; SINGH; MATZINGER, 2006). Já IL-4 é uma citocina que polariza as células para um perfil Th2. Tanto IFN- γ como IL-4 não são tipicamente produzidas por células dendríticas, assim, além das APCs e linfócitos *naive*, uma terceira célula do sistema imune inato seria importante para a produção dessas citocinas no momento da apresentação de antígeno e, dessa forma, crítica para a polarização para Th1 ou Th2 (CORTHAY, 2006). Um tipo celular capaz de assumir este papel e que não foi estudada na PCM são as células NKT, com capacidade de produzir rapidamente tanto IL-4 e IFN- γ além de outras citocinas, auxiliando na polarização para Th2 ou Th1, respectivamente.

1.3 Células iNKT

As células NKT correspondem a menos de 1% da fração de células T CD3+ presentes no sangue periférico e apresentam um TCR formado por cadeias α e β semi-invariante. Em mais de 80% dos casos o TCR é constituído pelas cadeias V α 24/J α 18 e V β 11 em humanos, sendo assim classificada como célula iNKT (NKT invariante ou NKT tipo I), entretanto, podem existir outras combinações de TCR. Tal receptor reconhece antígenos glicolipídicos ligados à molécula CD1d, a qual apresenta uma estrutura semelhante à molécula MHC-I. Outra característica dessas células é a expressão de marcadores de células NK, como as moléculas CD56 e CD161 (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007).

A molécula CD1d é constitutivamente expressa em células apresentadoras de antígeno, tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Ela apresenta uma estrutura que permite a apresentação de lipídios próprios ou exógenos. O ligante de iNKT mais bem estudado, uma α -galactosilceramida (α -GalCer), foi isolado de uma espécie da esponja marinha *Agelas mauritianus*, as quais são frequentemente colonizadas por bactérias como a *Sphingomonas wittchii*, sugerindo que a presença desse antígeno nessa esponja marinha seria devida a uma relação simbiótica remota (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007). Análogos de α -GalCer, outros glicosfingolipídios (GSLs) com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas, também podem ativar células iNKT (GOFF et al., 2004; WU et al., 2005). Esses GSLs são usados de forma experimental, porém num sistema natural não apresentam um papel fisiológico, ou seja, não são encontrados *in vivo* em infecções. Nesse sentido, outros ligantes apresentam um papel importante na ativação de células iNKT, embora o façam com uma magnitude bastante reduzida quando comparada ao α -GalCer. Glicolipídios de *Sphingomonas* sp (KINJO et al., 2005; MATTNER et al., 2005; SRIRAM, et al., 2005), *Mycobacteria tuberculosis* (FISCHER et al., 2004) e *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme (MATTNER et al., 2005) também foram identificados como capazes de estimular células iNKT, assim como gangliosídeos tumorais (WU et al., 2003). Células iNKT podem ainda ser ativadas por glicolipídios endógenos produzidos em resposta a uma infecção, não sendo necessária a participação de glicolipídios de micro-organismos. Em modelos animais, foi demonstrado que um GSL produzido pela célula

animal, o iGB3 (isoglobotrihexosilceramida), é apresentado por células dendríticas em resposta a certas infecções, como por *Salmonella* sp (MATTNER et al., 2005) ao invés de ocorrer apresentação de GSLs do micro-organismo. Porém, em humanos o iGB3 não é sintetizado e ligantes endógenos não são conhecidos (CHRISTIANSEN et al., 2008). Além de GSL, já foi demonstrada a capacidade de outras classes de glicolipídios em ativar células NKT, como derivados de diacilglicerol ou fosfolipídios com estrutura terciária similar a de glicosfingolipídios (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007).

A ativação de células iNKT ocorre rapidamente e essas células não possuem as características de células de T de memória e não necessitam de uma exposição prévia a antígenos (BRIGL; BRENNER, 2004), conferindo uma característica de célula de sistema imune inato. A ligação de células apresentadoras de antígeno à célula iNKT, via TCR ou CD40-CD40L, causa ativação de ambas as células. As células iNKT passam a produzir citocinas Th1 e Th2 e quimiocinas, sendo assim, consideradas importantes células moduladoras, envolvidas no reconhecimento de células tumorais, imunidade contra vários agentes infecciosos e no controle de doenças auto-imunes (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007). A principal citocina produzida pelas células iNKT humanas é IFN- γ , embora possa também produzir rapidamente IL-4, TNF- α , IL-10, IL-13 e GM-CSF (BERZINS; SMYTH; BAXTER, 2011). O fator que determina quais as citocinas que serão produzidas parece variar de acordo com o antígeno apresentado e mais especificamente, com o tipo de célula apresentadora, produtora de IL-12 ou não. Antígenos mais hidrossolúveis, como o OCH [(2*S*, 3*S*, 4*R*) - 1 - *O*- (α - D-galactopiranosil) - *N*- tetracosanoil-2 amino -1, 3, 4 -nonanetriol], um GSL com cadeia de esfingosina mais curta que o α -GalCer e que também é capaz de ativar células NKT, embora em menor grau, parecem ser preferencialmente expressos por células não produtoras de IL-12, como os linfócitos B. A ligação deste antígeno induz uma maior produção de IL-4.

Os dados sobre a participação das células NKT nas doenças infecciosas até hoje ainda são controversos. Em camundongos, a administração de α -GalCer promoveu o controle da infecção mesmo em camundongos susceptíveis à tuberculose (CHACKERIAN et al., 2002). Porém, outros trabalhos mostram que camundongos nocauteados para CD1d não apresentam piora no quadro clínico da tuberculose ou infecções por outras bactérias intracelulares (BEHAR, et al., 1999; HAYAKAWA et al., 2008). Em pacientes com tuberculose, observou-se que as células iNKT apresentavam

um perfil de ativação (MONTROYA et al., 2008), porém em número reduzido na circulação (SNYDER-CAPPIONE et al., 2007; SUTHERLAND et al., 2009). Destes dois trabalhos, um demonstra que o número de células é restabelecido após o tratamento (SUTHERLAND et al., 2009) mas no outro não (SNYDER-CAPPIONE et al., 2007), levantando um questionamento se essa redução no número de células iNKT poderia ser um dos fatores que contribuíram para o estabelecimento da doença ou se seria apenas um efeito secundário causado pela própria infecção. Estudos com fungos são mais raros. Na criptococose células iNKT são recrutadas para o pulmão e desempenham um importante papel na indução de resposta Th1 (KAWAKAMI et al., 2001). As células NKT e sua capacidade de serem ativadas por glicolipídios levantam a importância de antígenos não convencionais, como GSLs, na ativação ou modulação do sistema imune.

1.4 Glicosfingolipídios de *P. brasiliensis*:

Glicosfingolipídios (GSL) são um subtipo de glicolipídios formado por uma base esfingosina ligada a um ácido graxo através de uma ligação amida e a um radical polar, como um carboidrato.

Figura 2 - Representação esquemática de uma molécula de GSL

A região não delimitada da molécula corresponde à base esfingosina; delimitado em vermelho a região que corresponde a um ácido graxo ligado à esfingosina por uma ligação amida; em azul delimitada a posição onde ocorre a inserção de um radical polar.

FONTE: Figura adaptada de Lipid library (2012).

Esses GSLs estão presentes em todas as células eucarióticas, com uma grande heterogeneidade de estruturas da região glicídica e da porção ceramida de acordo com a espécie, tecido e estágio de desenvolvimento. Devido a sua característica estrutural (cadeias de ácidos graxos ligados a grupamentos polares), são moléculas anfipáticas, localizam-se nas membranas celulares e estão diretamente ligadas à fluidez e estabilidade das membranas. Mais do que simples componentes estruturais, estudos recentes demonstram que o papel desses GSLs é de grande importância para a manutenção de microdomínios de membrana altamente especializados, os *lipid rafts* (BAGNAT et al., 2000). Estes são agregados nas membranas celulares que formam fases menos fluídas, onde ancoram-se proteínas envolvidas em sinalização celular e de onde partem cascatas de transdução de sinal (YAMASHITA, 2011). Além disso, os GSLs podem estar envolvidos em eventos de interação entre células ou sítios de ligação a moléculas como a toxina da cólera ou a enterotoxina da *E. coli* (CONNELL, 2007). A própria infecção por *P. brasiliensis* parece envolver a adesão do fungo a GSLs presentes nos fibroblastos e células epiteliais (MAZA et al., 2008; YWAZAKI et al., 2011). Apresentam ainda um importante papel no tráfego de vesículas intracelular e servem como base para ligação de proteínas via âncoras de glicosilinositolfosfoceramida (GIPC - SIMONS, GERL, 2010; WARNECKE; HEINZ, 2003). Nos fungos, os GSL estão envolvidos na formação de brotamentos, proliferação e na alteração morfológica de hifas para leveduras em diversas espécies (NIMRICHTER; RODRIGUES, 2011; RODRIGUES et al., 2000; TOLEDO, M.S. et al., 2010).

Nos mamíferos, um exemplo desses GSLs são os gangliosídeos, esfingolipídios contendo ácido ciálico. Um protótipo de gangliosídeo é o GM1 (monosialotetrahexosil-gangliosídeo), o qual possui um importante papel fisiológico na plasticidade neuronal e em mecanismos de reparo no cérebro. Além disso, esses gangliosídeos podem ainda apresentar um papel imuno-modulador. Estudos sobre as propriedades dos *lipid rafts* na presença de gangliosídios suplementados em cultura demonstraram que essas moléculas podem ser incorporadas na membrana, onde passam a comportar-se como gangliosídeos endógenos e possivelmente perturbam as vias de transdução de sinal dependente desses *lipid rafts* (PRINETTI et al., 2009; SCHWARZMANN, 2001). Um estudo com leucócitos humanos demonstrou que a adição de gangliosídeos GM1 em cultura causa inibição da geração de espécies reativas de oxigênio em leucócitos (GAVELLA; KVEDER; LIPOVAC, 2010). Em camundongos, gangliosídeos derivados de células

tumorais são capazes de facilitar o crescimento tumoral, promovendo mecanismos de evasão do sistema imune e suprimindo resposta imune celular, agindo em diversos tipos celulares. A exposição de células T a esses gangliosídeos foi capaz de inibir a linfoproliferação (CHU; SHAROM, 1993; LI; VILLACRESES; LADISCH, 1995), aumentar o grau de apoptose de células T (DAS et al., 2008), favorecer a geração de resposta Th2 (CRESPO et al., 2006) e ainda inibir a ação de células apresentadoras de antígeno (MCKALLIP; LI; LADISCH, 1999; MOND et al., 1994), reduzindo a expressão de CD80, CD86 e a produção de IL-12 (JALES et al., 2010). Além disso, o pré-tratamento de células dendríticas com GM1 promoveu o desenvolvimento de células T regulatórias capazes de suprimir a função de células efectoras previamente diferenciadas (JALES et al., 2010).

Não só em modelos de câncer, mas também no caso de doenças infecciosas, GSLs podem apresentar um papel imunomodulador. GSLs derivados de *T. cruzi* inibem a ativação de células T através da porção ceramida, porém ativam a secreção de imunoglobulinas através da porção glicana (GOMES et al., 1996). Essa sub-classe de lipídios também foi capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12, reduzir a expressão de moléculas co-estimuladoras em células apresentadoras de antígeno e a maturação de células dendríticas, sugerindo um possível papel desses GSLs na sobrevivência do parasita nas células hospedeiras (BRODSKYN et al., 2002). Segundo Karmakar; Paul e De (2011), monócitos e células dendríticas infectadas por *Leishmania donovani* apresentam um padrão de distribuição de moléculas de CD1d alterado, fora de regiões de *lipid rafts* e não são capazes de ativar células NKT em resposta a α -GalCer. Entretanto, o tratamento dessas células com GSLs de *Leishmania donovani* modifica a estrutura dos *lipid rafts*, corrigindo a localização das moléculas de CD1d, a apresentação de α -GalCer por células infectadas e possibilitando a ativação de células NKT.

Foram descritos dois tipos principais de GSLs nas células eucariontes. Um deles é monohexosilceramida (CMH, do inglês *monohexosylceramide*), GSL neutro composto de um resíduo de carboidrato (galactose ou glucose) ligado covalentemente por ligação β a uma molécula de ceramida. Essa forma de GSL está presente em células de mamíferos e fúngicas, localizado principalmente no lado externo da membrana plasmática (WARNECKE; HEINZ, 2003). CMH foi identificado como único GSL neutro de diversos fungos patológicos e não patológicos, como *Histoplasma*

capsulatum, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e outros (TOLEDO et al., 2001). Em *P. brasiliensis*, CMH apresenta peso molecular aproximado de 800 g/mol. É formado por um resíduo de glucose (figura 3) e o radical ceramida pode variar entre 12 estruturas diferentes no caso de micélios, com cadeias de ácidos graxos variando de 20 a 25 carbonos, algumas hidroxiladas e/ou insaturadas. Já no caso das leveduras, apenas duas estruturas são encontradas, uma C20:0 (~82%) e outra de C16:1 (~18%), sem radicais hidroxilas ligados (TAKAHASHI et al., 1996). Entretanto na forma de levedura do *P. brasiliensis* esses compostos hidroxilados não estão presentes e CMH da levedura não é reconhecido pelo soro de pacientes com PCM (TOLEDO et al., 1995).

Figura 3 - Representação da molécula de CMH de *P. brasiliensis*

FONTE: Toledo (1999).

Outro tipo de GSL, este encontrado apenas nos fungos e plantas, são os derivados do inositol-fosfoceramida (IPC) (WARNECKE; HEINZ, 2003). Estas moléculas com peso molecular aproximado de 1450 g/mol são aniônicas, formadas por uma molécula de ceramida ligada a um radical inositol-fosfato e sofrem a ação de enzimas monohexosil-transferases. Essas enzimas não estão presentes nas células de mamíferos e adicionam um resíduo de carboidrato ao complexo IPC, formando GIPC. Isso faz com que essas moléculas sejam exclusivas de micro-organismos e alvos promissores para uma nova classe de drogas antifúngicas (GEORGOPAPADAKOU, 2000; SUGIMOTO; SAKOH; YAMADA, 2004), como Aureobasidinas (AEED et al., 2009), em fase de teste pré-clínicos.

No fungo *P. brasiliensis*, essa fração ácida de GSL é formada por dois compostos GIPCs, chamados de Pb-2 e Pb-3. O Pb-3 corresponde a 90 – 95% dos GSL ácidos da forma de levedura e sua estrutura foi descrita como $\text{Gal}\beta 1-6 (\text{Man } \alpha 1-3) \text{Man } \beta 1-2\text{Ins} - \text{P} - \text{Cer}$, ou seja, 3 resíduos de carboidrato, sendo 1 galactofuranose e 2 manoses ligadas ao IPC (LEVERY et al., 1998). - Neste trabalho Pb-3 foi denominado como Pb-1) e 5 - 10% dos GSL ácidos correspondem ao Pb-2, possível precursor do Pb-3, contendo apenas 2 manoses. Existem divergências na literatura quanto à nomenclatura desses glicolipídios. Inicialmente os glicolipídios foram ordenados de acordo com a sua descoberta, assim o Pb-3 era chamado de Pb-1 em trabalhos antigos. Atualmente a nomenclatura se dá de acordo com o número de resíduos de carboidrato (TAKAHASHI et al., 2009).

Figura 4 - Representação da molécula de GIPC de *P. brasiliensis*

FONTE: Adaptação de Levery et al. (1998).

Além de alterar a estrutura das membranas, certos GSLs podem agir como antígenos e serem apresentados via CD1d. A α -GalCer citada anteriormente e que tem a capacidade de ativar células iNKT, é um GSL contendo uma galactose ligada a uma ceramida via ligação α . Entretanto, sua estrutura possui uma diferença importante com CMH de fungos, uma vez que estes apresentam o carboidrato ligado à ceramida por

ligação β . Nesses casos, o carboidrato ficaria perpendicular à fenda de ligação da molécula CD1d, não se encaixando perfeitamente nessa molécula apresentadora (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007). Um estudo recente (PELLICCI et al., 2011) mostra a capacidade de glicolípídios endógenos, também com ligação β , serem apresentados por células CD1d e causar uma ativação mínima das células iNKT, evento importante durante o desenvolvimento e seleção positiva dessas células no timo. Outras células do sistema imune também podem ser ativadas ou então, terem suas ações moduladas por GSLs. O terminal β -galactofuranose da molécula de GIPC de *P. brasiliensis* é um determinante antigênico capaz de induzir a produção de anticorpos durante a infecção (BERTINI et al., 2007), fazendo com que o Pb-3 seja reconhecido pelo soro de aproximadamente 80% dos pacientes não tratados e no soro de 100% dos pacientes em início de tratamento. A resposta é baseada primeiramente em anticorpos do tipo IgM e posteriormente IgG1, com os títulos decaindo juntamente com os sinais clínicos (BERTINI et al., 2007), não tendo sido observada reação cruzada com histoplasmo (LEVERY et al., 1998).

Embora existam alguns trabalhos demonstrando a ação de GSLs no sistema imune, pouco se sabe dos efeitos de GSLs de *P. brasiliensis*. Existem apenas resultados preliminares (TAKAHASHI et al., 2009) que demonstram que CMH e GIPC de *P. brasiliensis* apresentam atividades supressora, dose - dependente, da resposta proliferativa de linfócitos esplênicos a concanavalina A. Entretanto, até onde é de nosso conhecimento, a ação desses GSLs na infecção humana por *P. brasiliensis* nunca foi estudada. Tendo em vista a capacidade de certos GSLs em modular a funcionalidade de células do sistema imune, o objetivo desse trabalho foi investigar se GSLs extraídos de *P. brasilienses* são capazes de alterar a função de monócitos de sangue periférico, células dendríticas derivadas de monócitos ou linfócitos T. Além disso, este trabalho verificou se existiriam alterações entre a resposta de indivíduos sem histórico de PCM e indivíduos susceptíveis à PCM, aqui representado por indivíduos curados da doença, no que se refere à funcionalidade de células iNKT ou à resposta aos GSLs extraídos de *P. brasiliensis*.

2 OBJETIVOS

Foram avaliados o efeito de GSLs extraídos de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, CMH e GIPC, sobre alguns aspectos da imunidade inata e sua influência na resposta adaptativa de indivíduos com ou sem histórico de paracoccidioidomicose. Dentre eles:

- resposta proliferativa de linfócitos em cultura de PBMCs na presença de GSLs frente à ativação por PHA, antígenos metabólico de *Candida albicans* (CMA) e gp43;

- resposta proliferativa de linfócitos em cultura com células dendríticas ativadas na presença de GSLs;

- expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40), receptores de PAMPs (Dectina-1, TLR2 e TLR4) e moléculas apresentadoras de antígenos (HLA-DR e CD1d) em monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos, após cultura com GSLs;

- capacidade fagocítica de macrófagos, na presença dos GSLs;

- produção de IL-2 e IFN- γ em sobrenadantes de culturas de PBMCs, de IL-10 e TNF- α em sobrenadantes de cultura de monócitos e IL-10 e IL-12 p40 em células dendríticas;

Em paralelo, avaliamos a capacidade de expansão de células iNKT e produção de citocinas por essas células.

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Casuística

Para este estudo foram utilizados seguintes grupos experimentais:

- a) grupo controle: 20 indivíduos saudáveis, sem histórico de PCM-doença, e que não habitavam zonas endêmicas de PCM. Estes foram selecionados dentre funcionários do Instituto de Medicina Tropical – IMT-USP;
- b) grupo curado: 15 indivíduos curados de PCM. Estes indivíduos curados fazem parte dos registros de pacientes da Divisão de Clínica Dermatológica e da Divisão de Moléstias Infecciosas do HC-FMUSP e foram convidados para participar deste estudo. Eles foram tratados por pelo menos dois anos até serem considerados curados e permanecem saudáveis há mais de 10 anos, com testes sorológicos indicando ausência de recaída da PCM (PCM-inativa). No momento da coleta, nenhum indivíduo apresentava sinais ou sintomas de qualquer doença ou sequelas decorrentes da PCM.

Um terceiro grupo experimental foi analisado em alguns experimentos, quando mencionado. Utilizamos amostras de sangue de cinco indivíduos saudáveis moradores de área endêmica (Pratânia-SP), com teste cutâneo para paracoccidina com pelo menos 12 mm de reação à leitura de 48 horas (grupo PCC+) e histoplasmina negativa. Esses indivíduos foram selecionados pela Dra. Cristina Crespo Rodrigues, pesquisadora que havia cadastrado diversos indivíduos PCC+ na cidade de Pratânia – SP em inquérito epidemiológico realizado durante seu doutorado na Faculdade de Medicina de Botucatu.

Aproximadamente 60 mL de sangue periférico foram coletados por punção venosa, implicando sempre em risco mínimo, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). As amostras de sangue foram utilizadas única e exclusivamente na realização deste trabalho. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina

– USP e pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas- ICB- USP. Todos os participantes (tabela 1) foram informados sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento (modelo de termo de consentimento - anexo A).

Tabela 1 - Relação de indivíduos incluídos no estudo.

GRUPO	SEXO	MÉDIA DE IDADE
CURADO	6 – sexo feminino (40%)	54 (41 – 67) anos
(15 indivíduos)	9 – sexo masculino (60%)	48,5 (29 – 68) anos
CONTROLE	10 – sexo feminino (50%)	44 (24 – 64) anos
(20 indivíduos)	10 – sexo masculino (50%)	38 (24 – 52) anos
PCC+	2 – sexo feminino (40%)	40,5 (25 – 56) anos
(5 indivíduos)	3 – sexo masculino (60%)	44 (21 – 67) anos

FONTE: Batista (2012)

3.2 Obtenção de GSLs de *Paracoccidioides brasiliensis*:

As frações de GSLs de leveduras de *P. brasiliensis* foram extraídas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, em colaboração com os professores Hélio Kiyoshi Takahashi, Anita Hilda Straus Takahashi e Marcos Sérgio de Toledo. A obtenção dessas frações foi feita da seguinte forma:

3.2.1 Extração de GSLs do *P. brasiliensis*:

- Crescimento fúngico e neutralização: *P. brasiliensis*, cepa Pb18 (cedido pelo Prof. Dr. Zoilo P. Camargo, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP) foi cultivado em meio PGY, contendo: peptona (5 gr/L),

glucose (15 gr/L) e extrato de levedura (5 gr/L) por aproximadamente sete dias. Após o crescimento, os fungos foram neutralizados com timerosal 0,02% por 48hs. Em seguida foram lavados primeiramente com tampão fosfato (PBS) contendo NaCl 0,15M e em seguida com água bidestilada.

- Filtragem e extração de lipídios totais: A solução contendo os fungos inativos foi filtrada em Erlenmeyer com auxílio de uma bomba de vácuo, descartando-se o meio e reservando os fungos secos. A massa de fungos foi então dissolvida em uma solução de isopropanol: hexano: água (IPA: H: W) (55:20: 25 v/v/v – Quimex, São Paulo, SP, Brasil) e maceradas em um triturador mecânico Omni-Mixer (Sorvall Inc, Wilmington, DE, EUA). O macerado foi novamente filtrado, porém desta vez o solvente escoado, contendo lipídios dissolvidos no solvente orgânico, foi reservado. A partir da massa fúngica retida, o procedimento foi repetido por mais 3 vezes. Uma quinta etapa de extração foi feita com o solvente clorofórmio: metanol (C: M - 2:1, v: v - Quimex). Os extratos obtidos foram secados em rota-evaporador, um sistema formado por banho-maria e um condensador para evaporação dos solventes.

Aos lipídios secos foi adicionada água e a solução foi sonicada. O material solúvel foi dialisado por 2 dias para a remoção de sais. Após este período o material foi novamente seco em rota-evaporador, ressuspensionado em C:M (2:1 v:v), e concentrado em fluxo de nitrogênio.

3.2.2. Separação das frações neutras e ácidas dos GSLs:

O extrato de lipídios foi ressuspensionado em C:M:W (30:60:8, v:v:v) e aplicados em uma coluna dietilaminoetil (DEAE-Sephadex A-25, Sigma – Aldrich, St Louis, EUA), previamente equilibrada no mesmo solvente. DEAE é uma resina com carga positiva utilizada para cromatografia por carga iônica, feita em coluna. Os lipídios totais foram aplicados no topo da coluna e em seguida foram aplicados os seguintes solventes: C:M:W (30:60:8, v:v:v); metanol; acetato de sódio (AcNa) 0,2% em metanol; AcNa 0,6% em metanol.

A fração correspondente aos glicolipídios neutros foi eluída no solvente C:M:W (30:60:6 v:v:v) e a fração ácida no solvente AcNa 02% em metanol. As frações AcNa

0,2% e 0,6% em metanol foram dialisadas por 5 dias por conterem sais. Ambas as frações, isoladas, foram secas em rota-vapor, ressuspensas em C:M (2:1, v:v) e secadas em jato de nitrogênio (TOLEDO et al, 1995).

3.2.3. Purificação das frações ácidas e neutras dos GSLs:

Fração neutra: Os GSLs neutros foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (Merck & Co., Darmstadt, Alemanha), coluna inerte que separa as moléculas pelo seu tamanho. Os seguintes solventes foram aplicados: clorofórmio; C:M (95:5, v:v); C:M (9:1, v:v); C:M (4:1, v:v); C:M (1:1, v:v) e IPA:H:W (55:20:25, v:v:v). O GSL neutro CMH foi eluído nos solventes C:M (9:1) e C:M (4:1).

Fração ácida: Da mesma forma que para o GSL neutro, foi utilizada uma coluna de sílica gel 60, entretanto, diferentes solventes foram aplicados: C:M (4:1, v:v); C:M (3:2, v:v); C:M (2:3, v:v); C:M (1:4, v:v) e IPA:H:W (55:20:25, v:v:v). No solvente C:M (2:3, v:v) foram eluídos os GIPCs (glicosilinositol-fosfoceramida), denominados de Pb2 e Pb3 que não podem ser separados nesse procedimento. O Pb-3 está presente em maior quantidade (90-95%) que Pb-2, seu metabólito intermediário. Em conjunto, esses GIPCs correspondem à fração ácida dos GSLs do *P. brasiliensis*.

Posterior à separação, ambas as frações neutra e ácida foram submetidas a uma etapa de hidrólise de fosfolipídios. Essa etapa remove possíveis compostos não esfingolipídicos, como triacilgliceróis ou glicerofosfolipídios. As amostras secas foram ressuspensas em 3 ml de uma solução de metanol:metilamina 30%: butanol (50: 37,5: 12,5, v:v:v, Quimex) e incubadas em banho a 50 °C, por 3 horas. As amostras foram novamente aplicadas em coluna de sílica gel, empregando-se os mesmos solventes descritos anteriormente para purificação de cada fração. Em seguida as amostras foram secadas em fluxo de nitrogênio.

A pureza dos GSLs foi verificada através de corrida cromatográfica em camada delgada, tendo como fase sólida uma placa de sílica gel 60 (Merck & Co., Darmstadt, Alemanha) e como fase móvel C:M: CaCl₂ 0,02% (60:40:9, v:v:v). Após a corrida, as placas foram borrifadas com 0,01% de primulina em 90% de acetona aquosa, coloração que revela presença de radical carboxila sob luz UV. Em seguida a placa foi borrifada

com orcinol/H₂SO₄ (TOLEDO et al., 1995), coloração que revela grupamentos de açúcares (figura 5).

Figura 5 - Purificação de GSLs de *P. brasiliensis*

Corrida cromatográfica em camada delgada, tendo como fase sólida uma placa de sílica gel e como fase móvel uma solução de C:M:CaCl₂ (90:60:13,5; v:v:v). A amostra padrão corresponde ao extrato de lipídios totais extraídos de *P. brasiliensis*. A segunda coluna corresponde ao GSL CMH purificado e na terceira coluna observa-se GIPC, formado pelos compostos Pb-2 e Pb-3. A revelação da placa foi feita com solução de orcinol/H₂SO₄, seguido de estufa a 100 ° C por 5 minutos.

FONTE: Batista (2012).

Nos casos em que a pureza não foi obtida simplesmente por essa separação descrita anteriormente, também foi realizada uma corrida de HPTLC preparativa (do inglês *high performance thin layer chromatography*), na qual os GSLs foram aplicados em placas de sílica e a cromatografia desenvolvida no solvente C:M:CaCl₂ 0,02% (60:40:9, v:v:v). As placas foram borrifadas com primulina para visualização dos GSLs sob luz UV. As regiões específicas de sílica foram raspadas da lâmina e os GSLs foram eluídos da sílica por sucessivas adições da solução de IPA:H:W (55:20:25, v:v:v), mantida em banho com ultra som. O sobrenadante contendo os GSLs de interesse foi removido após centrifugação e o extrato secado em rota-vapor.

3.2.4 Dosagem dos GSL:

Um volume conhecido das amostras foi aplicado em uma placa de cromatografia de camada delgada, ao lado de um padrão de manose de concentração já conhecida. Após a corrida de solvente pela placa, esta foi revelada com primulina e orcinol, como descrito anteriormente. A partir das áreas das bandas resultantes, foi possível determinar a quantidade de açúcares presentes na amostra aplicada. Para tal foi utilizado o programa Scion Image. Sabe-se que a porção de carboidratos corresponde a um terço da molécula de CMH e metade da molécula de GIPC. Assim, foi estimada a quantidade de cada GSL. Foram obtidos para este estudo um total de 38,5 mg de CMH e 25,7 mg de GIPC.

3.3 Antígeno gp43

Alíquotas de gp43 foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Maria J. S. Mendes-Giannini (MENDES-GIANNINI et al., 1989), responsável pelo laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara e pelo Prof. Dr. Carlos Taborda do Laboratório de Micologia do IMT-FMUSP, obtidas por cromatografia de afinidade.

3.4 Proliferação de linfócitos em cultura de PBMC na presença dos GSLs:

Para o isolamento de PBMCs, as amostras de sangue foram diluídas com mesmo volume de solução salina (pH 7,4) em tubos cônicos de 50 mL. Em seguida, a solução foi lentamente transferida, com o auxílio de pipetas Pasteur, para tubos contendo 10 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma – Aldrich) e centrifugado a 2200 rpm por 20 minutos, a 15 °C. A camada de células mononucleares que se forma na interface do Ficoll e do plasma foi coletada. Essas células foram lavadas 2 vezes com solução salina e ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% soro AB (SAB) (Sigma – Aldrich). A contagem do

número de células foi realizada por contador automatizado Cell-Dyn 1400 (Abbot Park Illinois, EUA).

PBMCs, na concentração de 2×10^6 /mL, foram adicionados em placas de 96 poços de fundo chato em RPMI + 10% SAB, em triplicatas. Para indução de proliferação celular foram utilizados o mitógeno PHA (Sigma- Aldrich, 5 µg/mL) por 3 dias ou os antígenos gp43 (2,5 µg/mL) ou CMA (Greer Laboratories, Lenoir, NC, EUA - 1 µg/mL) por 7 dias, na presença ou não de GIPC (25 µM) ou CMH (50 µM). 18 horas antes do fim da cultura, foi adicionado 25 µL de solução de H^3 -timidina -1 µCi/orifício (Amersham International, Buckinghamshire, UK), a qual é incorporada ao DNA de células em proliferação. Ao término da cultura, as células foram aspiradas com auxílio de coletor de células automático Mach II (Tomtek Harvester, Orange, CT, EUA) em membrana de nitrocelulose (Flow Laboratories Inc., Rockville, Maryland, EUA) e a contagem de emissões β foi feita em contador Betaplate 1205 (Perking – Elmer, Norwalk, CT, EUA). O resultado foi expresso como média aritmética da triplicata, em contagem por minuto (cpm). Valores de proliferação dos poços com antígenos ≥ 2 vezes o valor dos poços sem estímulo e com pelo menos 1000 cpm de diferença foram considerados positivos.

3.5 Cultura de monócitos com GSLs.

Primeiramente, monócitos foram isolados a partir de PBMC, com o auxílio de anticorpos anti-CD14 conjugados a *beads* magnéticas (MACS, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, EUA). PBMCs foram incubadas por 15 minutos em tampão EDTA (PBS + 0,5% de BSA e 2mM de EDTA) e os anticorpos anti-CD14 conjugados às *beads*, na concentração determinada pelo fabricante. Após essa incubação, as células foram lavadas com tampão EDTA e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram novamente ressuspensas em 500 µL de tampão EDTA e aplicadas em uma coluna circundada por um campo magnético, a qual retém as células ligadas às *beads*, deixando passar livremente as células CD14 negativas. As células retidas na coluna foram posteriormente eluídas adicionando-se 2 mL de tampão EDTA, retirando-se a coluna do campo magnético e aplicando a pressão de um êmbolo. As células foram lavadas em solução salina, ressuspensas em meio RPMI + SAB para cultura de

monócitos ou em meio AIM-V (Invitrogen Life Technologies) no caso de diferenciação posterior destes monócitos em células dendríticas. A pureza das culturas foi sempre superior a 90% (figura 6).

Figura 6 – Isolamento de monócitos por beads magnéticas acopladas a anti-CD14

Gráfico dotplot demonstrando A) tamanho e granulosidade das células isoladas por beads magnéticas acopladas a anti-CD14. B) Histograma demonstrando a eficiência do isolamento dos monócitos.

FONTE: Batista (2012).

Os linfócitos isolados foram congelados em nitrogênio líquido para serem utilizados em ensaios de co-cultivo com células dendríticas, descrito a seguir. Para tal, os linfócitos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos e às células foi adicionada uma solução de congelamento, que consistia de 50% de meio RPMI, 40% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). As células foram transferidas para criotubos, na concentração de 10×10^6 células por mL, levadas primeiramente ao freezer -80 °C e no dia seguinte armazenadas em nitrogênio líquido.

Por sua vez, os monócitos isolados foram cultivados em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^6 células/ mL, na presença ou não de CMH (50 μ M) ou GIPC (25 μ M). Após 24 horas, as células foram transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL, lavadas com 500 μ L de PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. Em seguida as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para a análise do fenótipo dessas células por citometria de fluxo.

Para essa marcação, aproximadamente 5×10^5 células foram ressuspensas num volume total de 25 μ L de um *pool* dos anticorpos de interesse. Para estas células foram adicionados os seguintes anticorpos: anti-CD14-ECD; anti-HLA-DR – FITC; anti-CD80-FITC; anti-CD40-PE (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA); anti-CD86-FITC; anti-CD1d-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA); anti-Dectina-1–FITC (US Biological, Swampscott, MA, EUA); anti-TLR-4-PE; anti-TLR-2–PE (e-Bioscience, San Diego, CA, EUA). As células foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos, no escuro e sob refrigeração. As células foram então ressuspensas em 400 μ L de solução de para-formaldeído 1% para fixação.

O citômetro de fluxo utilizado foi o EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Para a aquisição das amostras, a compensação dos filtros foi feita utilizando-se de células marcadas apenas com uma fluorescência, para cada um dos filtros utilizados (um tubo para ajuste do FITC, um tubo para PE, um tubo para ECD, etc). Foram empregados marcadores expressos em grande proporção nas células, como por exemplo anti-CD3, anti-CD14, anti-CD11c, possibilitando delimitar facilmente a região de células positivas. As células negativas foram definidas através da utilização de um tubo sem marcação. A análise dos resultados foi feita através do software Summit (Dako Cytomation, Fort Collins, CO, EUA, versão 4.0).

3.6 Avaliação de fagocitose de *P. brasiliensis* por monócitos:

Monócitos, na concentração de 1×10^6 /mL, foram ativados com GM-CSF (100 UI/mL) e cultivados com CMH (50 μ M) ou GIPC (25 μ M) por 18 horas. Após esse período foram adicionados células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18) marcados com carboxifluoresceína diacetato succinil éster (CFSE), molécula que emite fluorescência no canal FL1 do citômetro de fluxo.

Para esse ensaio, Pb18 foi cultivado em meio Fava Netto a 36,8 °C em tubos de vidro. No momento do ensaio, as leveduras foram coletadas com o auxílio de alças descartáveis e colocadas em PBS estéril, vortexados e deixados decantar por 20 minutos. As leveduras mais pesadas foram removidas, o restante foi lavado em PBS, centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante descartado e o número de células foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer. As leveduras foram marcadas com CFSE na concentração de 5 μ M a cada 1×10^7 fungos/mL por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram novamente lavadas com PBS, centrifugadas e adicionadas aos monócitos na proporção de 2 fungos:1 célula. Após o período de 4 horas, as células não aderentes (fungos não fagocitados) foram removidas e os monócitos coletados para marcação para citometria de fluxo.

Os monócitos foram marcados com o anticorpo anti-CD14-ECD, como descrito anteriormente. As células duplamente positivas para CD14-ECD e CFSE (leveduras) representam as células que fagocitaram os fungos ou possuem leveduras aderidas à sua superfície. Para ajustar os parâmetros do citômetro de fluxo, foram utilizados monócitos não marcados, monócitos marcados apenas com anti-CD14-ECD, fungos marcados com CFSE e não marcados.

3.7 Cultura de células dendríticas com GSLs

Para a geração de células dendríticas, monócitos, na concentração de 2×10^6 monócitos/mL, foram cultivados em meio AIM-V (5% de CO₂ e 37 °C) por 6 dias, na presença de GM-CSF (1000 UI/mL) e IL-4 (1000 UI/mL, Biosource, Camarillo, CA,

EUA). Este processo dá origem a células dendríticas imaturas (DCi), cuja diferenciação foi comprovada observando-se a expressão de CD11c e perda da expressão de CD14.

Para maturação destas células, primeiramente os antígenos de CMA (1 µg/mL) ou gp43 (2,5 µg/mL) foram adicionado à cultura. Concomitantemente foram adicionados CMH (50 µM) ou GIPC (25 µM). Após 4 horas, um pulso inflamatório com as citocinas TNF-α (50 ng/mL), IL-6 (100 ng/mL) e IL1-β (10 ng/mL, Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) foi adicionado (CASTIELLO et al., 2011). A maturação das células dendríticas foi comprovada pelo aumento na expressão de CD83, CD80 e CD86 (TANG; SALTZMAN, 2004) após 48 horas do pulso inflamatório.

A expressão de moléculas pelas células dendríticas foi avaliada 48 horas após o pulso inflamatório. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD11c-PCy5 (BD Pharmingen); anti-CD83-PE (Beckman Coulter); anti-CD14-ECD; anti-HLA-DR – FITC; anti-CD80-FITC; anti-CD40-PE; anti-CD86-FITC; anti-CD1d-PE; anti-Dectina-1-FITC; anti-TLR-4 -PE; anti-TLR-2 –PE.

3.8 Ensaio de co-cultivo de células dendríticas cultivadas com GSLs e linfócitos autólogos:

Monócitos, na concentração de 2×10^6 /mL foram transformados em DCi, como descrito anteriormente. As células foram então coletadas e 20.000 DCi foram adicionadas em 100 µL de meio AIM-V em placas de 96 orifícios. Para a maturação dessas células foram utilizados os antígeno de CMA (1 µg/mL) ou gp43 (2,5 µg/mL), na presença de CMH (50 µM) ou GIPC (25 µM). Após 4 horas o pulso inflamatório foi adicionado. 48 horas depois, linfócitos autólogos, que haviam sido congelados após a separação dos monócitos e linfócitos, foram descongelados e adicionados à cultura na concentração de 2×10^5 células por orifício. Foram feitas triplicatas para cada condição experimental. Ao fim de três dias de cultura, a proliferação celular foi avaliada pela incorporação de H³-timidina, como descrito no item 3.4.

3.9 Dosagem de citocinas em sobrenadante de culturas contendo GSLs

Amostras de sobrenadante das culturas foram coletadas em diferentes tempos de cultura, respeitando a cinética de produção de cada citocina. Para a dosagem de IL-2 e IFN- γ , amostras de sobrenadante de culturas estimuladas com PHA foram coletadas no tempo de 24 e 48 horas, respectivamente. IFN- γ também foi mensurado após 6 dias de cultura com antígeno CMA ou gp43. Para a dosagem de IL-10 e TNF- α , amostras de sobrenadante de cultura de monócitos foram coletadas após 8 horas e 24 horas, respectivamente. Já das culturas de células dendríticas, amostras de sobrenadante de cultura foram coletados após 48 horas do estímulo de maturação com citocinas pró-inflamatórias, como descrito no item 3.7. Destas culturas foram dosadas as citocinas IL-10 e IL-12 p40.

A dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits duo-sets ELISA (R&D Systems Inc, McKinley Place, MN, EUA). De maneira sucinta, placas de 96 orifícios de área reduzida (1/2 volume – Corining-Costar, Cambridge, MA, EUA) foram inicialmente sensibilizadas por 18 horas por anticorpos de captura específicos para cada citocina (anti-IL-2, anti-IFN- γ , anti-IL-10, anti-IL12p40 ou anti-TNF- α), na concentração determinada pelo fabricante. Após 3 séries de lavagem com tampão de lavagem (PBS + 0,05% de Tween 20), as placas foram bloqueadas com PBS+ 0,1% de BSA por 1 hora. As amostras ou padrão foram adicionadas e incubadas por 2 horas. Após nova série de lavagem, anticorpos de detecção conjugados à enzima peroxidase foram adicionados e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. O substrato tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado e incubado por 20 minutos. Após a neutralização da reação com H₂SO₄, a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA).

3.10 Cultura de células iNKT

Para esta análise foram utilizadas células congeladas como descrito no item 3.5, pois esta etapa do projeto foi desenvolvida durante estágio de outubro a dezembro de 2009 no laboratório de “Cytokines, Hematopoiese et Réponse Immune” (Centre National de La Recherche Scientifique – unidade 8147, no Hospital Necker- França), sob orientação da Dra. Maria do Carmo Leite de Moraes.

Foram analisadas amostras de 5 indivíduos curados, 5 controles e 5 PCC+. PBMCs na concentração de 1×10^6 células/mL foram cultivadas em placas de 24 orifícios incubados em meio RPMI + 10% SAB e 100 ng/mL de α -galactosilceramida (α -GalCer, Axxora Life Sciences Coger, Paris, França) e IL-2 (1000 UI/mL, Sigma – Aldrich), adicionado após 18 horas. Em alguns experimentos foram utilizados outros agonistas de células NKT, como OCH ou IGb3 (Axxora Life Sciences Coger), ambos na concentração de 500 ng/mL. As culturas foram mantidas por aproximadamente 12 dias para expansão das células iNKT.

O número de células iNKT foi avaliado antes e após a cultura com α -GalCer. O reconhecimento destas células foi feito pela marcação com o tetrâmero carregado com PBS57 (molécula análoga a α -GalCer) marcado com APC, fornecido pelo National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

A produção de citocinas por células iNKT periféricas ou pós-expansão foi avaliada através de marcação intracelular para citometria de fluxo. Para estímulo de produção e retenção intracelular das citocinas foram utilizados *phorbol myristate acetate* (PMA, 50 ng/mL), ionomicina (500 ng/mL) e brefeldina A (10 μ g/mL) (Sigma – Aldrich).

Os anticorpos utilizados para avaliar a produção de citocinas por células iNKT foram: anti-IL-4 - APC; anti-IFN- γ – PeCy7; anti-IL-10 – FITC (e-Bioscience). Excepcionalmente para os experimentos envolvendo células iNKT, foi utilizado o citômetro FACS Canto II (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, EUA), com um mínimo de 50.000 eventos viáveis. A aquisição foi feita através do Software FACS Diva e os resultados analisados o software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, OR, EUA).

3.11 Análise estatística:

Os resultados foram avaliados com o auxílio do software GraphPad Prisma, versão 5 (GraphPad software, EUA). Diferenças significativas entre dois grupos foram determinadas preferencialmente por testes não-paramétricos (Friedman, Wilcoxon), assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro for menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Resultados com CMH extraído de *P. brasiliensis*:

Primeiramente, verificamos se existiria um efeito citotóxico de CMH extraído de *P. brasiliensis* sobre PBMCs. Concentrações de 25, 50 e 100 μM de CMH foram adicionadas em culturas de células de indivíduos controles, na presença do mitógeno PHA ou somente meio RPMI + SAB. Após três dias de cultura, as células foram coradas com Azul de Tripán. Como demonstrado na figura abaixo (figura 7), a porcentagem de células vivas variou de 91 a 97% em todas as condições experimentais, não havendo diferença estatística entre as culturas contendo ou não CMH, estimuladas ou não com PHA. Assim, nas concentrações testadas o CMH não alterou a viabilidade celular.

Figura 7 - Viabilidade de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de CMH.

Avaliação por Azul de Tripán da viabilidade de PBMCs após 3 dias de cultura com PHA e 25, 50 ou 100 μM de CMH. Resultado expresso como média da porcentagem de células vivas $\pm$ erro padrão. $n \geq 5$.

FONTE: Batista (2012).

Após verificar que CMH de *P. brasiliensis* não é citotóxico até a concentração de 100 μM , passamos a procurar possíveis efeitos biológicos deste GSL sobre células do sistema imune. A partir de PBMCs de indivíduos controles, foram realizados ensaios de linfoproliferação em culturas estimuladas com PHA por 3 dias, adicionando concentrações crescentes de CMH (variando de 6,3 a 100 μM). Em culturas sem mitógeno, o CMH não foi capaz de causar proliferação celular, porém na presença de PHA, este GSL elevou significativamente a linfoproliferação nas concentrações de 25 μM e 50 μM , quando comparado ao grupo estimulado com PHA. A contagem de emissões β por segundo (cpm) das culturas com PHA foi, em média, de 13831 ± 5455 cpm; na presença de PHA e 25 μM de CMH esse valor passa para 23104 ± 8906 cpm e com 50 μM de CMH para 31410 ± 10287 cpm, este último representando um aumento de mais de 100% (figura 8).

Figura 8 - Linfoproliferação em PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de CMH.

Avaliação de proliferação por incorporação de H^3 -timidina. PBMCs foram cultivadas por três dias com PHA e diferentes concentrações de CMH. Resultado expresso como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 6$. B: condição basal (apenas meio de cultura). * = $p \leq 0.05$ e *** = $p \leq 0.001$ em relação ao grupo "PHA + zero de CMH", teste Anova pareado, com pós teste de Friedman.

FONTE: Batista (2012).

Enquanto que no grupo controle CMH elevou a proliferação de linfócitos em culturas com PHA, em culturas com CMA a proliferação não foi alterada (figura 9). Tanto a cultura de CMA ou a cultura de CMA + CMH tiveram um valor de cpm por volta de 13000, não havendo diferença estatística. Nesta mesma figura, demonstramos um comparativo da resposta das culturas com antígenos e culturas com PHA e PHA + CMH, nas quais, como citado na figura anterior, CMH eleva significativamente a linfoproliferação.

Figura 9 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA ou CMA, na presença de CMH - Grupo controle.

Avaliação de linfoproliferação por incorporação de H^3 -timidina. PBMCs do grupo controle foram cultivadas com PHA e PHA + CMH por 3 dias ou CMA e CMA + CMH por 7 dias. Resultado expresso como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 10$. B: condição basal (apenas meio de cultura). *** = $p \leq 0.001$ em relação ao grupo PHA, teste T pareado (Wilcoxon).
FONTE: Batista (2012).

A concentração de IFN- γ produzida nas culturas estimuladas com PHA foi de 1850 ± 673 pg/mL, não sendo alterada por CMH (PHA + CMH = 1960 ± 653 pg/mL). A produção de IL-2 variou de 393 ± 133 pg/mL nas culturas com PHA para 480 ± 199 pg/mL em PHA + CMH, não havendo diferença entre a concentração dessas citocinas nestas culturas (figura 10).

Figura 10 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de CMH - Grupo controle.

Dosagem por ELISA da concentração de IL-2 (A) e IFN- γ (B) no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo controle. Células foram estimuladas com PHA por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença ou não de 50 μ M de CMH. $n \geq 6$. B: condição basal.

FONTE: Batista (2012).

Embora nas culturas com antígeno a proliferação das células do grupo controle não tenha sido alterada por CMH, a dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de 6 dias demonstra uma redução de mais de 50 % na produção de IFN- γ em culturas com CMA + CMH em comparação a CMA (figura 11).

Figura 11 - Dosagem de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA, na presença de CMH – Grupo controle.

Dosagem por ELISA da concentração de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo controle. Células foram estimuladas com CMA por 6 dias na presença ou não de 50 μ M de CMH. $n \geq 6$. B: condição basal. * = $p \leq 0,05$ teste T pareado – Wilcoxon. FONTE: Batista (2012).

Por outro lado, quando avaliamos a linfoproliferação em indivíduos curados, observamos um comportamento bem discrepante em relação aos indivíduos controles. Houve uma redução significativa na proliferação em resposta ao antígeno gp43 na presença de 50 μ M de CMH (de 6445 ± 1945 cpm para 3017 ± 1079 cpm) e nenhuma alteração na proliferação por PHA (~ 43000 cpm). Para CMA, a diferença na proliferação de linfócitos na presença de CMH não foi estatisticamente significativa (figura 12).

Figura 12 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA, CMA ou gp43, na presença de CMH – Grupo curado.

Avaliação de linfoproliferação por incorporação de H^3 -timidina. PBMCs do grupo curado foram cultivadas com PHA e PHA + CMH por 3 dias ou CMA, CMA + CMH, gp43 e gp43 + CMH por 7 dias. Resultado expresso como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 11$. B: condição basal. *** = $p \leq 0.001$ em relação ao grupo gp43, teste T pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Paralelamente a estes resultados, as concentrações de IL-2 e IFN- γ encontraram-se significativamente reduzidas nas culturas com PHA + CMH em comparação às culturas com PHA somente. A concentração de IL-2 passou de 349 ± 164 pg/mL com PHA para 204 ± 107 pg/mL com PHA + CMH e a produção de IFN- γ caiu de 1829 ± 519 pg/mL com PHA para 1092 ± 310 pg/mL com PHA + CMH (figura 13).

Figura 13 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de CMH – Grupo curado.

Dosagem por ELISA da concentração de IL-2 (A) e IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo curado. PBMCs foram estimuladas com PHA por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença ou não de 50 μ M de CMH. $n \geq 8$. B: condição basal. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ em relação à PHA, teste T pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Nas culturas de CMA + CMH a média de produção de IFN- γ foi de 115 ± 86 pg/mL em comparação a 380 ± 207 pg/mL nas culturas com CMA. No caso das culturas com gp43 a produção desta citocina foi de 635 ± 239 pg/mL, quando que nas culturas de gp43 + CMH esta foi de 301 ± 132 pg/mL. Entretanto a redução que ocorreu nas culturas com CMA e gp43 não foi significativa (figura 14). IL-2 não foi dosada em culturas com antígeno, pois devido sua cinética de produção, o pico aconteceria por volta do terceiro dia de cultura (BENARD et al., 2001) e amostras de sobrenadante foram colhidas no sexto dia.

Figura 14 - Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA ou gp43, na presença de CMH – Grupo curado.

Dosagem por ELISA da concentração de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo curado. PBMCs foram estimuladas com CMA ou gp43 por 6 dias na presença ou não de $50 \mu\text{M}$ de CMH. $n \geq 6$. B: condição basal.

FONTE: Batista (2012).

A PHA é um mitógeno que leva à linfoproliferação por ativação direta dos linfócitos. Entretanto, em culturas com antígenos, como gp43 ou CMA, a linfoproliferação ocorre depois da captura e apresentação do antígeno pelas células

apresentadoras. Como CMH causou modulação da linfoproliferação também em culturas com antígeno, nos interessamos em observar se a atividade de APCs estaria sendo moduladas por esse GSL.

Para isso, utilizamos culturas de monócitos isolados de PBMCs por beads magnéticas. Foram incubados 2×10^6 monócitos, em placas de 24 poços, com 50 μ M de CMH ou apenas meio+SAB por 24 horas. Em seguida avaliamos a expressão de moléculas co-estimuladoras – CD80, CD86 e CD40; moléculas apresentadoras de antígenos – CD1d e HLA-DR e PRRs: TLR-2, TLR-4 e dectina-1, por citometria de fluxo. Podemos observar que em ambos os grupos, controle e curado, houve um aumento significativo na porcentagem de monócitos (células CD14+) expressando CD80 e CD86. No grupo controle (figura 15), a expressão de CD80 passou de $15,6 \pm 5,4\%$ das células basais para $18,9 \pm 5,6\%$ das células cultivadas com CMH. A porcentagem de células expressando CD86 teve um aumento semelhante, de $64,8 \pm 7,3\%$ para $72,7 \pm 6,9\%$ das células com CMH.

Figura 15 - Expressão de CD80 e CD86 em monócitos cultivados com CMH – Grupo controle.

Avaliação da expressão de CD80 e CD86, por citometria de fluxo, em monócitos do grupo controle cultivados em meio de cultura (B: basal) ou na presença de 50 μ M de CMH por 24 horas. $n \geq 8$. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$, teste T, pareado - Wilcoxon.
FONTE: Batista (2012).

As outras moléculas avaliadas nos monócitos do grupo controle não foram moduladas por CMH (figura 16)

Figura 16 – Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e CD40 em monócitos cultivados com CMH – Grupo controle.

Avaliação da expressão de HLA-DR, CD1d, CD40, TLR2 e TLR4 e dectina-1 em monócitos do grupo controle, cultivados em meio de cultura (basal) ou na presença de 50 μ M de CMH por 24 horas. $n \geq 6$.

FONTE: Batista (2012).

No grupo curado (figura 17) a porcentagem de células expressando CD80 foi de $36,0 \pm 8,3\%$ nas culturas basais e de $44,4 \pm 8,2\%$ nas culturas com CMH. A expressão de CD86 se elevou de $63,9 \pm 8,4\%$ para $72,3 \pm 7,9\%$ das células com CMH.

Figura 17 - Expressão de CD80 e CD86 em monócitos cultivados com CMH – Grupo curado.

Avaliação da expressão de CD80 e CD86, por citometria de fluxo, em monócitos do grupo curado cultivados em meio de cultura (B: basal) ou na presença de 50 μ M CMH por 24 horas. $n \geq 8$. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$, teste T, pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Não houve diferença na porcentagem de células expressando HLA-DR, CD1d, CD40, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 na presença de CMH também neste grupo (figura 18).

Figura 18 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e CD40 em monócitos cultivados com CMH – Grupo curado.

Avaliação da expressão de HLA-DR, CD1d, CD40, TLR2, TLR4 e dectina-1 em monócitos do grupo curado cultivados em meio de cultura (basal) ou na presença de 50 μ M de CMH por 24 horas. $n \geq 6$.

FONTE: Batista (2012).

Além do aumento de células expressando CD80 e CD86 em ambos os grupos, houve uma maior intensidade de expressão dessas moléculas, evidenciado pelo deslocamento do histograma (figura 19) e pelo cálculo de intensidade média de fluorescência integrado (iMFI = média de intensidade de fluorescência x número de células positivas / 100, SHOOSHTARI et al., 2010- tabela 2).

Figura 19 – Histograma demonstrativo da expressão de CD80 e CD86 em monócitos

Gráfico hitograma representativo de ambos os grupos, demonstrando a expressão de CD86 (gráfico A) e expressão de CD80 (gráfico B). A linha preta demonstra o perfil de expressão por monócitos do grupo basal, cultivado apenas em meio de cultura. Em vermelho, o perfil de expressão de células cultivadas com CMH por 24 horas.

FONTE: Batista (2012).

Na tabela 2 observa-se um aumento estatisticamente significativo na intensidade de expressão de CD80 e CD86 na presença de CMH, em ambos os grupos. Quando as condições basais dos grupos controle e curado foram comparadas, observa-se uma aparente redução na expressão de HLA-DR, CD80, CD86, TLR4 e dectina-1 no grupo curado, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa.

Tabela 2 - Intensidade média de fluorescência integrada (iMFI) de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em monócitos cultivados com CMH.

	CONTROLE		CURADO	
	B	CMH	B	CMH
HLA-DR	271,3 ± 101,1	390,2 ± 197,2	192, 5 ± 47,0	222,6 ± 41,1
CD1d	2,9 ± 0,7	2,8 ± 0,7	4,6 ± 0,9	4,4 ± 1,0
CD86	27,2 ± 7,9	32,4 ± 10,1*	16,0 ± 2,3	21,3 ± 3,6*
CD80	11,3 ± 3,7	13,9 ± 4,6 *	8,3 ± 1,7	10,5 ± 2,4*
CD40	85,5 ± 23,8	93,0 ± 29,6	64,3 ± 7,8	76,5 ± 16,8
TLR2	34,1 ± 8,1	35,5 ± 9,7	40,0 ± 10,4	39,8 ± 9,9
TLR4	103,5 ± 39,9	113,5 ± 50,6	52,8 ± 12,4	57,0 ± 16,1
DCT1	26,2 ± 7,1	29,2 ± 6,8	10,8 ± 2,8	10,2 ± 3,5

n ≥ 6. Células cultivadas por 24 horas na presença de 50 µM de CMH. DCT1= dectina-1.

*= $p \leq 0,05$, teste T pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Embora CMH altere a expressão de CD80 e CD86 em monócitos no grupo controle e curado, este não causou nenhuma alteração na produção de TNF- α ou IL-10 em ambos os grupos. A produção de TNF- α foi de 1473 ± 222 pg/mL no grupo controle e 1364 ± 220 pg/mL no grupo curado. Um resultado interessante é que a produção de IL-10 nos indivíduos curados é 2,3 vezes maior que nas células dos indivíduos controles, sendo que nos primeiros se manteve por volta de 900 pg/mL enquanto que nos controles foi de aproximadamente 400 pg/mL (figura 20).

Figura 20 - Dosagem de TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de cultura de monócitos cultivados com CMH.

Dosagem por ELISA de TNF- α (A) e IL-10 (B) em sobrenadantes de cultura de monócitos de indivíduos controles e curados, após 8 e 24 horas de cultivo na presença ou não de 50 μ M de CMH, respectivamente. $n \geq 8$. B: condição basal. * = $p \leq 0,05$ em relação a B do grupo controle, teste T não pareando - Mann-Whitney.

FONTE: Batista (2012).

Uma das principais funções dos monócitos é a fagocitose de micro-organismos para posterior eliminação. Por isso, nós procuramos verificar se CMH poderia modular essa função, contribuindo para a resistência ou susceptibilidade à PCM. Para isso, leveduras de *P. brasiliensis* foram coradas com CFSE e adicionadas a culturas de monócitos previamente cultivados com CMH por 24 horas, na proporção de 2 fungos: 1 célula. Após 4 horas de contato dos monócitos com as leveduras, a fagocitose ou aderência dos fungos aos monócitos foi avaliada por citometria de fluxo. Foi considerada fagocitose positiva as células com dupla marcação para CD14 e CFSE (figura 21).

Figura 21 - Estratégia de análise de fagocitose por citometria de fluxo.

Para a análise de fagocitose, os monócitos foram isolados da população total (A). Para compensação dos filtros, foram adquiridas somente células CD14+ (B) ou fungos marcados (C). As células CD14+ / fungos (CFSE) + foram consideradas como células que realizaram fagocitose (D).

FONTE: Batista (2012).

Para todas as condições experimentais, aproximadamente 50% dos monócitos realizaram fagocitose ou possuíam leveduras aderidas à sua superfície. CMH não alterou esse padrão em nenhum dos grupos controle e curado (figura 22).

Figura 22 - Avaliação da capacidade de fagocitose por monócitos previamente incubados com CMH.

Avaliação por citometria de fluxo da capacidade de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*. Monócitos foram previamente incubados ou não com 50 μ M de CMH por 24 horas. Em seguida, leveduras coradas com CFSE foram adicionadas na proporção de 2 leveduras: 1 célula e incubadas por 4 horas. Células CD14+/CFSE+ foram consideradas como células que realizaram fagocitose. n =7. B: condição basal.

FONTE: Batista (2012).

O efeito do CMH na maturação e expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, moléculas co-estimuladoras e PRRs também foi avaliado nas células dendríticas. Células dendríticas imaturas (DCi) receberam CMA e CMH (50 μ M) e após 4 horas foram maturadas (vide item 3.7). Após 48 horas do estímulo de maturação, a expressão de CD83, CD86, CD80, CD40, HLA-DR, CD1d, TLR-2, TLR-4 e dectina-1, em células CD11c, foi avaliada por citometria de fluxo.

Como era esperado, a porcentagem de células dendríticas expressando CD83, CD86 e CD80 aumentou significativamente após sua maturação. De maneira geral, CD83 e CD80 eram expressos em menos de 20% das DCi e passaram a ser expressos em mais de 60% delas após a maturação. CD86 era expresso em aproximadamente 45% das DCi e passou a ser expresso em mais de 80% das células dendríticas maduras (DCm), em ambos os grupos. A adição de CMH no momento da maturação não alterou a expressão das moléculas CD83, CD86, CD80, CD40, HLA-DR, CD1d, TLR-2, TLR-4 e dectina-1 nas DCm no grupo controle, como mostrado na figura 23.

Figura 23 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH – Grupo controle.

Avaliação da expressão de CD11c, CD83, moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas do grupo controle maturadas ou não na presença de 50 μ M de CMH. $n \geq 5$. * = $p \leq 0,05$ em relação a DCi, Teste T, pareado – Wilcoxon.
 FONTE: Batista (2012).

Por outro lado, no grupo curado, além da elevação da expressão de DC83, CD80 e CD86 esperados após a maturação, o CMH elevou ainda mais a expressão de CD86 nas DCm+CMH, que foi de $86,3 \pm 2,3\%$, em relação a DCm ($74,0 \pm 5,6\%$). Outra molécula que teve sua expressão modulada pelo CMH foi a dectina-1. Enquanto essa molécula era expressa em $11,4 \pm 4,0\%$ das DCm, nas culturas de DCm+CMH passou a ser expressa em $20,0 \pm 5,4\%$ das células (figura 24).

Figura 24 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH – Grupo curado.

Avaliação da expressão de CD11c, CD83, moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas do grupo curado maturadas na presença ou não de 50 μ M de CMH. $n \geq 5$. * = $p \leq 0,05$ em comparação com DCi; # = $p \leq 0,05$ em comparação com DCm, teste T, pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

O cálculo de iMFI demonstra um aumento na intensidade de expressão de CD83, CD86, CD80 e TLR4 nas células DCm em relação às DCi, em ambos os grupos. Observa-se uma redução na expressão de HLA-DR e CD86 nas DCi do grupo curado em relação às mesmas células do grupo controle. Houve ainda um aumento do iMFI da dectina-1 nas células DCm+CMH em relação a DCm, somente no grupo curado (tabela 3), em consonância com o resultado de porcentagem.

Tabela 3 - iMFI de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com CMH.

	CONTROLE			CURADO		
	DCi	DCm	DCm+CMH	DCi	DCm	DCm+CMH
CD11c	146,4 ±41,0	202,2±39,4	137,4 ±27,2	179,8 ±28,7	200,8 ±27,1	177,0 ±31,2
CD83	6,9 ± 2,9	38,8 ± 11,8	30,0 ± 7,6	12,6 ± 4,5	52,0 ± 23,7	47,8 ± 16,0
HLA-DR	834,1±180,6	1430 ± 336	848,9±175,4	349,7±63,4#	981,5±332,7	777,6±203,9
CD1d	1,8 ± 0,7	7,9 ± 5,2	12,1 ± 8,2	1,3 ± 0,6	8,4 ± 5,5	10,9 ± 8,8
CD86	35,5 ± 9,8	91,8 ± 25,8	66,8 ± 15,3	13,7 ± 4,0 #	41,9 ± 17,6	52,4 ±22,8
CD80	5,0 ± 1,2	18,8 ± 6,4	17,6 ± 4,6	4,7 ± 3,6	17,7 ± 6,0	14,6 ± 2,3
CD40	95,3 ± 13,7	101,7±17,5	99,6 ± 11,4	93,7± 13,7	102,9 ± 7,3	93,9± 11,1
TLR2	9,8 ± 2,7	12,4 ± 2,5	15,4 ± 2,9	6,4 ± 1,7	9,2 ± 3,1	9,3 ± 2,5
TLR4	29,6 ± 6,0	42,4 ± 10,4	42,2 ± 8,4	34,3 ± 4,2	57,5 ± 12,2	59,6 ± 10,7
DCT1	7,9 ± 2,2	10,3 ± 4,3	17,9 ± 4,7	5,1 ± 1,3	4,2 ± 1,6	9,4 ± 2,7*

n ≥ 5, DCT1= dectina-1. * = $p \leq 0,05$ em comparação com DCm do mesmo grupo, teste T, pareado – Wilcoxon; # $p \leq 0,05$ em comparação com DCi do grupo controle, teste não pareado - Mann-Whitney.

FONTE: Batista (2012).

Amostras de sobrenadante de cultura de células dendríticas foram coletadas após 24 horas e a produção de IL-10 e IL12 foi avaliada. Infelizmente IL-12p70 não foi detectada em amostras de sobrenadante, assim, optamos pela dosagem de IL-12 p40. No grupo controle a produção de IL-10 foi de 58 ± 17 pg/mL, $65,1 \pm 8,4$ pg/mL e $49,5 \pm 17,7$ pg/mL nas DCi, DCm e DCm+CMH, respectivamente. Enquanto isso, a produção de IL-12 p40 foi de $44,4 \pm 39,8$ pg/mL nas DCi, $162,7 \pm 85,3$ pg/mL nas DCm e $134,1 \pm 56,7$ pg/mL nas DCm + CMH. CMH não causou alteração significativa na produção dessas citocinas no grupo controle (figura 25).

Figura 25 – Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de CMH – Grupo controle.

Dosagem por ELISA de IL-10 (A) e IL-12 p40 (B) produzidas por células dendríticas do grupo controle maturadas na presença ou não de $50 \mu\text{M}$ de CMH. Aliquotas de sobrenadante foram coletadas 24 horas após o estímulo de maturação. $n \geq 3$.

FONTE: Batista (2012).

Por outro lado, no grupo curado houve um aumento significativo na produção de IL-10 por DCm em relação às mesmas células do grupo controle. CMH reduziu significativamente a produção de IL-10, que passou de 214 ± 97 pg/mL nas DCm para $97,4 \pm 38,9$ pg/mL nas DCm + CMH. Associada à redução de IL-10, houve um aumento significativo de IL-12 p40 nas DCm + CMH ($229,3 \pm 52,0$ pg/mL) quando comparado a DCm ($142,4 \pm 36,3$ pg/mL) (figura 26).

Figura 26 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de CMH – Grupo curado.

Dosagem por ELISA de IL-10 (A) e IL-12 p40 (B) produzidas por células dendríticas do grupo curado maturadas na presença ou não de 50 μ M de CMH. Aliquotas de sobrenadante foram coletadas 24 horas após o estímulo de maturação. $n \geq 3$. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ em relação à DCm, teste T pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Foi observada também a capacidade de células dendríticas em estimular a proliferação de linfócitos. Para isso, células dendríticas pulsadas com CMA e maturadas na presença de CMH ou não por 48 horas. Essas células então foram cultivadas com linfócitos autólogos e a proliferação celular foi avaliada após 3 dias pela incorporação de H^3 -timidina. Como controle do ensaio, foram feitas culturas de DCi + linfócitos; DCm sem a adição de linfócitos e culturas contendo apenas linfócitos. CMH reduziu significativamente a resposta proliferativa a CMA induzida pelas células dendríticas. No grupo controle, a proliferação nas culturas com DCm foi em média de 6030 ± 2182 cpm, enquanto que para as células dendríticas maturadas com CMH, a média foi de 2608 ± 771 cpm (figura 27).

Figura 27 - Linfoproliferação em co-cultura de linfócitos e células dendríticas maturadas na presença de CMH – Grupo controle.

Avaliação da linfoproliferação em co-cultivo com células dendríticas por incorporação de H^3 -timidina. DCs apresentando CMA [DCm(CMA)] foram maturadas na presença ou não de 50 μ M de CMH. Linfócitos autólogos foram adicionados na proporção de 1 DC: 10 linfócitos. Os resultados estão expressos como média de cpm $\pm$ erro padrão. n = 6. * = $p \leq 0,05$ em comparação a [DCm (CMA)], teste T pareado – Wilcoxon. FONTE: Batista (2012).

Já no grupo curado (figura 28) foram utilizados dois antígenos diferentes, gp43 e CMA, apresentados pelas DCs. Os resultados mostram que, da mesma forma que observado no grupo controle, a presença de CMH durante a maturação de DCs do grupo curado reduziu a capacidade linfo-proliferativa antígeno-específica induzida pelas DCs. Em média, as células apresentando CMA levaram a uma linfoproliferação de 3765 ± 443 cpm e a presença do CMH inibiu a linfoproliferação para 2608 ± 770 cpm. No caso de apresentação de gp43, a linfoproliferação foi de 3400 ± 222 cpm e passou a 2333 ± 145 cpm quando a DC foi maturada com CMH.

Figura 28 - Linfoproliferação em co-cultivo de células dendríticas maturadas na presença de CMH e linfócitos autólogos – Grupo curado.

Avaliação da linfoproliferação em co-cultivo com células dendríticas por incorporação de H^3 -timidina. DCs apresentando CMA [DCm(CMA)] ou gp43 [DCm(gp43)] foram maturadas na presença ou não de 50 μ M de CMH. Linfócitos autólogos foram adicionados na proporção de 1 DC: 10 linfócitos. Os resultados estão expressos como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 8$. ** = $p \leq 0,01$ em comparação ao respectivo grupo cultivado sem CMH, teste T pareado - Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Em resumo, as principais alterações causadas pelo CHM foram:

- elevar a expressão de CD80 e CD86 em monócitos de ambos os grupos;
- elevar linfoproliferação estimulada por PHA no grupo controle;
- reduzir linfoproliferação induzida por antígenos no grupo curado;
- reduzir a produção de IFN- γ em culturas de PBMCs com antígenos;
- reduzir a linfoproliferação em ensaios de co-cultivo de células dendríticas e linfócitos autólogos, em ambos os grupos.
- elevar a produção de IL-12p40 e reduzir a produção de IL-10 por células dendríticas do grupo curado.

4.2 Resultados com GIPC extraído de *P. brasiliensis*

Os ensaios com GIPC foram feitos simultaneamente ao CMH e estão demonstrados em sessões separadas para facilitar a análise. Da mesma forma que para o CMH, o primeiro procedimento foi verificar a toxicidade do GIPC sobre PBMCs. PBMCs foram cultivadas na presença ou não de PHA, com as concentrações de 0, 25, 50 e 100 μM de GIPC. Após 3 dias, a viabilidade celular foi verificada pela coloração com Azul de Tripán. O número de células vivas variou de 90 a 98% do número total de células tanto nas culturas com ou sem mitógeno, não havendo diferença estatística entre os as diferentes concentrações de GIPC testadas (figura 29).

Figura 29 - Viabilidade de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de GIPC.

Avaliação por Azul de Tripán da viabilidade de PBMCs após 3 dias de cultura com PHA e 25, 50 ou 100 μM de GIPC. Resultado expresso como média da porcentagem de células vivas $\pm$ erro padrão. $n \geq 5$.

FONTE: Batista (2012).

Ao testarmos a linfoproliferação em PBMC com diferentes concentrações de GIPC e PHA, não verificamos alterações. Os linfócitos estimulados com PHA proliferaram até o nível de 16080 ± 4001 cpm em média, e as culturas contendo PHA + GIPC, em qualquer das concentrações testadas, variaram de 18126 ± 4941 cpm a 19828 ± 5567 cpm, não sendo esses valores estatisticamente diferentes da cultura com PHA apenas (figura 30).

Figura 30 - Linfoproliferação em PBMCs estimuladas com PHA, na presença de diferentes concentrações de GIPC.

Avaliação de proliferação por incorporação de H^3 -timidina. PBMCs foram cultivadas por três dias com PHA e diferentes concentrações de GIPC. Resultado expresso como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 6$. B: condição basal (apenas meio de cultura).
FONTE: Batista (2012).

Embora nenhuma das concentrações utilizadas de GIPC tenha alterado a proliferação de linfócitos em PBMCs, passamos a utilizar a concentração de 25 μ M de GIPC para os demais experimentos. Nesta concentração, 7 de 9 indivíduos, apresentaram um discreto aumento de proliferação. A dosagem de 25 μ M equivale a aproximadamente 40 μ g/mL.

Além de linfoproliferação com PHA, testamos também a resposta proliferativa frente a antígenos de CMA e gp43, na presença de 25 μ M de GIPC, tanto para os indivíduos controles (figura 31) e curados (figura 32). Em ambos os grupos, a média de cpm para PHA e PHA + GIPC foi de aproximadamente 42500 cpm, nas culturas com CMA e CMA + GIPC foi de 10000 cpm e na cultura com gp43, exclusiva do grupo curado, a média com ou sem GIPC foi de aproximadamente 6500 cpm. Diferente do efeito de CMH, GIPC não alterou linfoproliferação.

Figura 31 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA ou CMA, na presença de GIPC - Grupo controle.

Avaliação de linfoproliferação por incorporação de H^3 -timidina. PBMCs do grupo controle foram cultivadas com PHA e PHA + GIPC por 3 dias ou CMA e CMA + GIPC por 7 dias. Resultado expresso como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 10$. B: condição basal (apenas meio de cultura).

FONTE: Batista (2012).

Figura 32 - Linfoproliferação de PBMCs estimuladas com PHA, CMA ou gp43, na presença de GIPC – Grupo curado

Avaliação de linfoproliferação por incorporação de H^3 -timidina. PBMCs do grupo curado foram cultivadas com PHA e PHA + GIPC por 3 dias ou CMA, CMA + GIPC, gp43 e gp43 + GIPC por 7 dias. Resultado expresso como média de cpm $\pm$ erro padrão. n = 9. B: condição basal.

FONTE: Batista (2012).

Embora a proliferação de linfócitos não tenha sido alterada pelo GIPC em culturas de PHA, CMA e gp43 para ambos os grupos, especificamente no grupo controle a produção de IL-2 e IFN- γ foi significativamente aumentada por GIPC nas culturas com PHA. A concentração dosada de IL-2 passou de 393 ± 133 pg/mL nas culturas com PHA para 554 ± 183 pg/mL nas culturas de PHA + GIPC. Da mesma forma, a produção de IFN- γ passou de 2035 ± 715 pg/mL nas culturas de com PHA para 3757 ± 1109 pg/mL em PHA + GIPC (figura 33). Na cultura com CMA, a produção de IFN- γ não foi significativamente alterada pelo GIPC (figura 34).

Figura 33 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de GIPC - Grupo controle.

Dosagem por ELISA da concentração de IL-2 (A) e IFN- γ (B) no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo controle. Células foram estimuladas com PHA por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença ou não de 25 μ M de GIPC. $n \geq 6$. B: condição basal. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ - teste T pareado – Wilcoxon.
FONTE: Batista (2012).

Figura 34 - Dosagem de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA, na presença de GIPC – Grupo controle.

Dosagem por ELISA da concentração de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo controle. Células foram estimuladas com CMA por 6 dias na presença de 25 μ M de GIPC. n=6. B: condição basal.
FONTE: Batista (2012).

No grupo de indivíduos curados, por outro lado, a produção de IL-2 e IFN- γ não foi alterada por GIPC nas culturas estimuladas com PHA (figura 35).

Figura 35 - Dosagem de IL-2 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com PHA, na presença de GIPC – Grupo curado

Dosagem por ELISA da concentração de IL-2 (A) e IFN- γ (B) no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo curado. Células foram estimuladas com PHA por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença de 25 μ M de GIPC. $n \geq 8$. B: condição basal.
FONTE: Batista (2012).

Nas culturas com antígeno observa-se uma tendência de redução na produção de IFN- γ pelo GIPC, entretanto esta não foi estatisticamente significativa (figura 36).

Figura 36 - Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com CMA ou gp43, na presença de GIPC – Grupo curado.

Dosagem por ELISA da concentração de IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs do grupo curado. Células foram estimuladas com CMA ou gp43 por 6 dias na presença ou não de 25 μ M de GIPC. $n \geq 8$. B: condição basal.

FONTE: Batista (2012).

A análise da expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígenos e PRRs em monócitos demonstram que a adição de 25 μ M de GIPC por 24 horas é incapaz de modular a expressão das moléculas HLA-DR, CD1d, CD80, CD86, CD40, TLR-2, TLR-4 e dectina-1. As figuras 37 e 38 demonstram os resultados de porcentagem de células positivas a essas moléculas, nos grupos controle e curado, respectivamente.

Figura 37 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e moléculas co-estimuladoras em monócitos cultivados com GIPC – Grupo controle.

Avaliação da expressão de HLA-DR, CD1d, CD86, CD80, CD40, TLR2 e TLR4 e dectina-1 em monócitos do grupo controle, cultivados em meio de cultura (basal) ou na presença de 25 μ M de GIPC por 24 horas. $n \geq 6$.

FONTE: Batista (2012).

Figura 38 - Expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, PRRs e moléculas co-estimuladoras em monócitos cultivados com GIPC – Grupo curado.

Avaliação da expressão de HLA-DR, CD1d, CD40, TLR2, TLR4 e dectina-1 em monócitos do grupo curado cultivados em meio de cultura (basal) ou na presença de 25 μ M de GIPC por 24 horas. $n \geq 6$.

FONTE: Batista (2012).

A análise de iMFI também não demonstram alteração significativa na intensidade de expressão das moléculas, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - iMFI de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígenos e PRRs em monócitos cultivados com GIPC por 24 horas.

	CONTROLE		CURADO	
	B	GIPC	B	GIPC
HLA-DR	271,3 ± 101,1	258,4 ± 86,0	192, 5 ± 47,0	215,1 ± 54,0
CD1d	2,9 ± 0,7	3,1 ± 0,8	4,6 ± 0,9	4,0 ± 0,9
CD86	27,2 ± 7,9	26,9 ± 6,5	16,0 ± 2,3	17,7 ± 2,4
CD80	11,3 ± 3,7	11,4 ± 3,7	8,3 ± 1,7	9,6 ± 2,6
CD40	85,5 ± 23,8	85,1 ± 23,5	64,3 ± 7,8	62,42 ± 16,9
TLR2	34,1 ± 8,1	32,8 ± 10,0	40,0 ± 10,4	40,1 ± 13,7
TLR4	103,5 ± 39,9	109,6 ± 49,2	52,8 ± 12,4	58,2 ± 16,6
DCT1	26,2 ± 7,1	25,01 ± 6,0	10,8 ± 2,8	6,8 ± 1,6

n ≥ 6. DCT1 = dectina-1

FONTE: Batista (2012).

A dosagem de TNF- α e IL-10 no sobrenadante de culturas demonstrou não existir diferença na produção dessas citocinas por monócitos na presença de GIPC. Como já descrito anteriormente, foi apenas verificado que monócitos de indivíduos do grupo controle produzem aproximadamente 2 vezes mais IL-10 que células de indivíduos do grupo controle (figura 39).

Figura 39 - Dosagem de TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de cultura de monócitos cultivados com GIPC.

Dosagem por ELISA de TNF- α (A) e IL-10 (B) em sobrenadantes de cultura de monócitos de indivíduos controles e curados, após 8(A) e 24(B) horas de cultivo na presença ou não de 25 μ M de GIPC. $n \geq 5$. B: condição basal. * = $p \leq 0,05$ em relação a B do grupo controle, teste T não pareando - Mann- Whitney.
FONTE: Batista (2012).

Não houve diferença na capacidade fagocítica entre células do grupo controle e curado cultivadas apenas em meio de cultura. A incubação dos monócitos com GIPC elevou a capacidade de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, especificamente no grupo controle. Enquanto na condição basal houve fagocitose em $53,4 \pm 8,6\%$ dos monócitos, nos monócitos incubados por 24 horas com GIPC a fagocitose ocorreu em $73,4 \pm 5,1\%$ deles. No grupo curado, o grau de fagocitose foi em torno de 50 % por monócitos tratados ou não com GIPC (figura 40).

Figura 40 - Avaliação da capacidade de fagocitose por monócitos previamente incubados com GIPC.

Avaliação por citometria de fluxo da capacidade de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*. Monócitos foram previamente incubados com 25 μM de GIPC por 24 horas. Em seguida, leveduras coradas com CFSE foram adicionadas na proporção de 2 leveduras: 1 célula e incubadas por 4 horas. $n \geq 7$. * = $p \leq 0,05$ em relação à B (condição basal) do grupo controle, teste T pareado –Wilcoxon; # $p \leq 0,05$ em relação à GIPC do grupo controle, teste T não-pareado -Mann-Whitney.

FONTE: Batista (2012).

Outra propriedade do GIPC foi reduzir o nível de maturação das células dendríticas no grupo controle. A maturação das células dendríticas elevou a expressão de CD83, CD80 e CD86 em relação às DCi. Quando as células foram maturadas na presença de GIPC, não ocorre elevação significativa na expressão dessas moléculas, deixando-as num nível intermediário (figura 41). Esses resultados são comprovados pela análise do iMFI das moléculas (tabela 5) que demonstram uma maior intensidade de expressão de CD80, CD86 e CD83 nas DCm + GIPC em relação a DCm. As outras moléculas analisadas não foram alteradas pela presença do GIPC.

Figura 41 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com GIPC – Grupo controle.

Avaliação da expressão de CD11c, CD83, moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas do grupo controle maturadas na presença de 25 μ M de GIPC. $n \geq 5$. * = $p \leq 0,05$, Teste T, pareado – Wilcoxon.
 FONTE: Batista (2012).

Nos indivíduos curados, GIPC reduziu a expressão de CD80 nas DCm + GIPC em comparação a DCm, porém não reduziu a expressão de CD83 e CD86 como no grupo controle. Neste grupo ainda, GIPC elevou a expressão de dectina-1 nas DCm+GIPC ($21,4 \pm 4,9$ %) em relação às DCm ($11,4 \pm 4,0$ %), demonstrados tanto no gráfico de número de células positivas (figura 42) como pelo cálculo de iMFI (tabela 5), onde se observada que a expressão dessa molécula encontrou-se superior ao observado em DCm.

Figura 42 - Expressão de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com GIPC – Grupo curado.

Avaliação da expressão de CD11c, CD83, moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas do grupo curado maturadas na presença de $25 \mu\text{M}$ de GIPC. $n \geq 5$. * = $p \leq 0,05$, Teste T, pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

Tabela 5 - iMFI de moléculas co-estimuladoras, apresentadoras de antígeno e PRRs em células dendríticas cultivadas com GIPC.

	CONTROLE			CURADO		
	DCi	DCm	DCm+GIPC	DCi	DCm	DCm+GIPC
CD11c	146,4 ± 41,0	202,2 ± 39,4	143,5 ± 27,8	179,8 ± 28,7	200,8 ± 27,1	195,3 ± 31,0
CD83	6,9 ± 2,9	38,8 ± 11,8	14,9 ± 4,0 *	12,6 ± 4,5	52,0 ± 23,7	50,0 ± 21,9
HLA-DR	834,1 ± 180,6	1430 ± 336	790,2 ± 196,6	349,7 ± 63,4 #	981,5 ± 332,7	667,5 ± 109,9
CD1d	1,84 ± 0,7	7,9 ± 5,2	6,9 ± 4,5	1,3 ± 0,6	8,4 ± 5,5	6,6 ± 4,5
CD86	35,5 ± 9,8	91,8 ± 25,8	46,8 ± 9,6 *	13,7 ± 4,0 #	41,9 ± 17,6	42,4 ± 19,6
CD80	5,0 ± 1,2	18,8 ± 6,4	10,9 ± 3,0 *	4,7 ± 3,6	17,7 ± 6,0	8,3 ± 1,9*
CD40	95,3 ± 13,7	101,7 ± 17,5	100,8 ± 10,7	93,7 ± 13,7	102,9 ± 7,3	97,8 ± 10,8
TLR2	9,8 ± 2,7	12,4 ± 2,5	9,7 ± 1,7	6,4 ± 1,7	9,2 ± 3,1	7,0 ± 2,2
TLR4	29,6 ± 6,0	42,4 ± 10,4 *	30,9 ± 7,4	34,3 ± 4,2	57,5 ± 12,2	48,4 ± 12,8
DCT1	7,9 ± 2,2	10,3 ± 4,3	7,8 ± 2,3	5,1 ± 1,3	4,2 ± 1,6	9,6 ± 3,0*

n ≥ 5. DCT1= dectinal. *= $p \leq 0,05$ em relação ao DCm do próprio grupo, teste T pareado – Wilcoxon; # = $p \leq 0,05$ em relação a DCi do grupo controle, teste T não pareado -Mann-Whitney.

FONTE: Batista (2012).

No grupo controle, a redução na maturação das células dendríticas pelo GIPC não foi acompanhada por alteração na produção de citocinas IL-10 e IL-12 p40. A produção de IL-10 foi em média de 58 ± 17 pg/mL, 65 ± 8 pg/mL e 33 ± 14 pg/mL nas culturas de células dendríticas imaturas (DCi), maduras (DCm) e células dendríticas maturadas com GIPC (DCm+GIPC), respectivamente. Nessas mesmas culturas, a produção de IL-12 p40 foi de 44 ± 40 pg/mL, 163 ± 85 pg/mL e 162 ± 84 pg/mL, na mesma ordem (figura 43).

Figura 43 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo controle.

Dosagem por ELISA de IL-10 (A) e IL-12 p40 (B) produzidas por células dendríticas do grupo controle maturadas na presença de $25 \mu\text{M}$ de GIPC. Alíquotas de sobrenadante foram coletadas 24 horas após o estímulo de maturação. $n \geq 4$.
FONTE: Batista (2012).

Por outro lado, no grupo curado a produção de IL-10 por DCm foi superior à produção pelas células do grupo controle e foi reduzida pela presença de GIPC durante a maturação das células dendríticas. As DCi produziram $65,3 \pm 21,9$ pg/mL de IL-10 e $19,5 \pm 9,4$ pg/mL de IL-12p40. Com a maturação, a concentração dosada dessas citocinas foi de $214,2 \pm 96,9$ pg/mL de IL-10 e $142,4 \pm 36,3$ pg/mL de IL-12. GIPC reduziu a concentração de IL-10 para $31,5 \pm 9,9$ pg/mL, porém não alterou a produção de IL-12 p40 ($152,7 \pm 43,1$ pg/mL) (figura 44).

Figura 44 - Dosagem de IL-10 e IL-12p40 produzidas por células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo curado.

Dosagem por ELISA de IL-10 (A) e IL-12 p40 (B) produzidas por células dendríticas do grupo curado maturadas na presença de 25 μ M de GIPC. Alíquotas de sobrenadante foram coletadas 24 horas após o estímulo de maturação. $n \geq 3$. ** = $p \leq 0,01$, teste T pareado - Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

As alterações nas células dendríticas promovidas por GIPC foram acompanhadas por uma redução da capacidade destas em induzir linfoproliferação em ensaios de co-cultivo. Em ambos os grupos, controle e curado, a maturação das células dendríticas na presença de GIPC fez com que sua capacidade de induzir linfoproliferação em resposta aos antígenos CMA e gp43 fosse inibida. No grupo controle, a proliferação caiu de 6030 ± 2182 cpm em DCm (CMA) para 2180 ± 800 cpm em DCm (CMA) + GIPC (figura 45).

Figura 45 - Linfoproliferação em co-culturas de linfócitos e células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo controle.

Avaliação da linfoproliferação em co-cultivo com células dendríticas por incorporação de H^3 -timidina. DCs apresentando CMA [DCm(CMA)] foram maturadas na presença ou não de GIPC. Linfócitos autólogos foram adicionados a culturas de células dendríticas maduras, na proporção de 1 DC: 10 linfócitos. Os resultados estão expressos como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n = 6$. * = $p \leq 0,05$ em comparação a DCm (CMA), teste T pareado – Wilcoxon.

FONTE: Batista (2012).

De maneira similar, a média de linfoproliferação nos indivíduos do grupo curado caiu de 3765 ± 443 cpm em [DCm(CMA)] para 2431 ± 379 cpm em [DCm(CMA)] + GIPC. Quando o antígeno gp43 foi apresentado pelas células dendríticas, a queda na proliferação causada pelo GIPC foi de 3400 ± 222 cpm [DCm(gp43)] para 1844 ± 126 cpm [DCm(gp43)] + GIPC (figura 46).

Figura 46 - Linfoproliferação em co-culturas de linfócitos e células dendríticas maturadas na presença de GIPC – Grupo curado.

Avaliação da linfoproliferação em co-cultivo com células dendríticas por incorporação de H^3 -timidina. DCs apresentando CMA [DCm(CMA)] ou gp43 [DCm(gp43)] foram maturadas na presença ou não de GIPC. Linfócitos autólogos foram adicionados na proporção de 1 DC: 10 linfócitos. Os resultados estão expressos como média de cpm $\pm$ erro padrão. $n \geq 8$. **= $p \leq 0,05$ em comparação ao respectivo grupo cultivado sem GIPC, teste T pareado (Wilcoxon).

FONTE: Batista (2012).

Em resumo, as principais alterações causadas por GIPC foram:

- elevar a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* no grupo controle;
- reduziu a maturação de células dendríticas, principalmente no grupo controle;
- reduzir a produção de IL-10 por células dendríticas do grupo curado;
- reduzir a linfoproliferação em co-culturas de DCs e linfócitos autólogos, em ambos os grupos.

4.3 Resultados com células iNKT

As células iNKT são células que, quando ativadas, são capazes de produzir rapidamente citocinas com perfil Th1 e Th2. Um prejuízo na função dessas células poderia implicar em alterações no direcionamento de uma resposta imune específica e contribuir para a susceptibilidade a uma infecção. Por isso, procuramos verificar a capacidade de células iNKT de indivíduos curados, controles e PCC+ em proliferar e de produzir citocinas.

Primeiramente, o número de células iNKT circulantes foi determinado pela marcação com tetrâmero acoplado à PBS57, molécula análoga à α -GalCer, que se liga especificamente ao TCR dessas células. A porcentagem de células iNKT em PBMC foi similar entre os grupos PCC+, controle e curado, em média $0,12 \pm 0,08\%$; $0,15 \pm 0,05\%$ e $0,08 \pm 0,02\%$, respectivamente (figura 47). A capacidade de células iNKT em proliferar frente ao estímulo de α -GalCer também foi avaliada. Para isso, PBMCs foram cultivadas com α -GalCer e IL-2 por aproximadamente 12 dias e seu número determinado.

Como observado na mesma figura (47 - A), nessas culturas a população de células iNKT passou para $8,6 \pm 6,9\%$, $13,3 \pm 7,9$ e $7,7 \pm 3,1\%$ das PBMCs dos grupos PCC+, controle e curado, respectivamente, com um índice de expansão de $195,4 \pm 87,1$; $252,2 \pm 114,8$ e $235,7 \pm 76,6$, na mesma ordem (figura 47 - B). Não houve diferença no número de células NKT circulantes ou pós-expansão com α -GalCer entre os grupos, assim como no índice de expansão dessas células.

Figura 47 - Porcentagem inicial e expansão de células iNKT

Porcentagem de células NKT circulantes (ex-vivo) ou após 12 dias de cultura com α -GalCer e IL-2, detectadas pela marcação com tetrâmero ligado a PBS57 (A). Em (B), o índice de expansão das células iNKT de cada grupo, calculado pela razão do número final após cultura com α -GalCer por 12 dias/número inicial de células iNKT. $n \geq 5$.

FONTE: Batista (2012).

Embora as células iNKT estejam presentes em mesmo número e expandam de maneira similar entre os grupos, a funcionalidade dessas células ainda não havia sido investigada. Por isso, avaliamos a capacidade de produção de citocinas em células pré e pós-expansão. A estratégia da análise de citometria para citocinas está demonstrada a seguir (figura 48).

Figura 48 - Estratégia de análise das células iNKT

Resultado de um indivíduo controle, exemplificando as análises de citometria de fluxo, seguido de re-análise no software FLOW-JO (TT= tetrâmero). A partir do quadrante em linfócitos (A), foram isoladas as células iNKT (B) e a partir dessas células foi verificada a produção de IL-4 (C); IFN- γ (D) e IL-10 (E).

FONTE: Batista (2012).

Para a análise de produção de citocinas, as células foram ativadas com PMA e ionomicina, na presença de brefeldina, por 6 horas. As células foram marcadas com anticorpos específicos para detecção de IL-4, IL-10 e IFN- γ intracelular. Não houve diferença entre a produção dessas citocinas entre os grupos. Na média dos três grupos, 41,5%, 4,7% e 0,20% das células iNKT *ex vivo* foram positivas para IFN- γ , IL-4 e IL-10, respectivamente (figura 49).

Figura 49 - Produção de citocinas por células iNKT *ex-vivo*

Porcentagem de células iNKT (tetrâmetro+) e IFN- γ , IL-4 ou IL-10 positivas em células *ex-vivo*, estimuladas com PMA e ionomicina. $n \geq 4$.

FONTE: Batista (2012).

Já para as células cultivadas por 12 dias com α -GalCer (figura 50) 66,6%, 13,7% e 5,6% das células iNKT foram positivas para as mesmas citocinas. Também não houve diferença entre os grupos.

Figura 50 - Produção de citocinas por células iNKT pós- expansão com α -GalCer

Porcentagem de células iNKT (tetrâmetro+) e IFN- γ , IL-4 ou IL-10 positivas em células após expansão com α -GalCer e IL-2, estimuladas com PMA e ionomicina. $n \geq 3$.
FONTE: Batista (2012).

Embora PMA e IONO sejam utilizados para potencializar a produção por citocinas pelas células, a ativação que ocorre é inespecífica e não envolve sinalização via TCR. Por isso, avaliamos a produção de citocinas também em células cultivadas apenas com α -GalCer (100 ng/mL) por 6 horas, sem estímulo de PMA e IONO. Dessa forma, a molécula de α -GalCer é apresentada via CD1d por APCs e é reconhecida pelo TCR de células iNKT, mimetizando condições naturais de ativação. Isso propiciaria observar se existiria algum prejuízo na ativação das iNKT via TCR, entre os grupos. IL-10 não foi detectada nessas culturas e os resultados de produção de IL-4 e IFN- γ estão demonstrados a seguir. Não houve diferença estatística na produção de IFN- γ , que foi, em média, positiva em 9,5% das células, ou IL-4 que foi produzida por 1,5% das células iNKT em todos os grupos (figura 51), sugerindo que não existe diferença na capacidade de ativação das células iNKT via TCR.

Figura 51 - Produção de citocinas após ativação com α -GalCer por 6 horas

Porcentagem de células iNKT (tetrâmero+) e IFN- γ ou IL-4 positivas em células após ativação com α -GalCer por 6 horas.

FONTE: Batista (2012).

Outras moléculas sintéticas foram originadas a partir de pequenas modificações químicas na molécula de α -GalCer, dando origem a novos agonistas de células iNKT, porém estes menos potentes. Dentre eles destacam-se o glicolípido sintético OCH, que aumenta a produção de citocinas Th2 e o iGb3 (isoglobotrilhexoseceramida), um ligante endógeno conhecido. Ambos ligantes foram utilizados em ensaios de expansão para verificar o comportamento das células NKT frente a outros agonistas.

Para essas duas moléculas, o grau de expansão das células iNKT foi discreto em comparação ao que ocorre com culturas com α -GalCer. Após cultura com OCH e IL-2, nos três grupos a porcentagem de células iNKT passou de 0,12 para 6,1%, em média. Em culturas com iGb3 e IL-2 praticamente não houve expansão. Os grupos PCC+, controle e curados apresentaram resultados semelhantes (figura 52).

Figura 52 - Expansão de células iNKT com OCH e iGb3

Porcentagem de células iNKT circulantes (*ex-vivo*) ou após 12 dias de cultura com OCH (A) ou iGb3 (B) + IL-2, a partir de culturas com 2×10^6 PBMCs, detectadas pela marcação com tetrâmero ligado a α -PBS57. $n \geq 3$.

FONTE: Batista (2012).

Ao analisarmos a produção de citocinas nas células iNKT após cultura com OCH e iGB3, novamente não houve diferença entre os grupos. Nas culturas com OCH, as produções de IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram positivas em aproximadamente 85,3%; 21,2% e 1,1% das células iNKT, respectivamente (figura 53). Nas culturas com iGB3 esses valores foram em torno de 66,7%, 10,7% e 0,5%, na mesma ordem (figura 54).

Figura 53 - Produção de citocinas pós expansão de células iNKT com OCH

Porcentagem de células iNKT (tetrâmetro+) e IFN- γ , IL-4 ou IL-10 positivas em células após expansão com OCH e IL-2, estimuladas com PMA e ionomicina. $n \geq 3$.
FONTE: Batista (2012).

Figura 54 - Produção de citocinas pós- expansão de células iNKT com iGB3

Porcentagem de células iNKT (tetrâmetro+) e IFN- γ , IL-4 ou IL-10 positivas em células após expansão com iGb3 e IL-2, estimuladas com PMA e ionomicina. $n \geq 3$.

FONTE: Batista (2012).

Em resumo, a análise de células iNKT revelou:

- não houve diferença no número de células iNKT circulantes entre os grupos;
- todos os grupos apresentaram capacidade de expansão similar frente aos agonistas a-GalCer, OCH e iGB3;
- todos os grupos produziram níveis comparáveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 *ex vivo* ou após expansão com a-GalCer, OCH e iGB3;
- a ativação de células iNKT via CD1d resultou em expansão e produção de citocinas de maneira similar entre todos os grupos.

5 DISCUSSÃO

Glicosíngolipídios (GSLs) são importantes componentes estruturais das membranas de todas as células eucarióticas, localizados principalmente em *lipid rafts*, isto é, regiões de membrana mais compactas onde se agregam receptores e proteínas, levando à concentração destas e facilitando a ativação de diversas cascatas de transdução de sinal (ZHANG et al., 2009). Em células fúngicas, esses GSLs se concentram em regiões de brotamento e participam de processos como germinação de esporos, proliferação e alteração de morfologia (LEVERY et al., 2002; NIMRICHTER, RODRIGUES, 2011; RODRIGUES et al., 2000; TOLEDO, M.S. et al., 2010). Certos GSLs são capazes de modular a funcionalidade de células do sistema imune, como reduzir (GIORGIO et al., 2003; LI; GOMES et al., 1996; VILLACRESES; LADISH, 1995) ou elevar a resposta proliferativa de linfócitos (BLANK et al., 2005; JURY et al., 2004; KRISHNAN et al., 2004), causar apoptose de células T (DAS et al., 2008); inibir a maturação de células dendríticas (BRODSKYN et al., 2002; JALES et al., 2010; SHEN; LADISCH, 2002), inibir a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos (PETRUSCA et al., 2010), reduzir a expressão de moléculas co-estimuladoras (BRODSKYN et al., 2002) e a geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos (GAVELLA; KVEDER; LIPOVAC, 2010); alterar o padrão de expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (KARMAKAR; PAUL; DE, 2011) entre outras funções. Essas alterações em células do sistema imune poderiam representar um mecanismo de escape em infecções por fungos, ou de forma contrária, poderiam promover ou potencializar o reconhecimento celular e/ou desencadeamento de resposta imune.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se GSLs extraídos de *Paracoccidioides brasiliensis* possuem atividade imuno-moduladora, através de uma triagem nas principais células envolvidas na resposta ao *P. brasiliensis*. Com isso, demonstramos a importância de moléculas glicolípídicas no cenário da resposta imune, onde desempenhava até recentemente um papel apenas figurante. Enquanto que mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos já são de longa data conhecidos como de grande influência na resposta imune, glicolípídios começaram a insurgir como antígenos não convencionais, apresentado a células por meio de receptores não convencionais e agindo nas células por mecanismos de ação também nada convencionais. Por suas

características biológicas distintas às de moléculas protéicas e a ausência de ligantes conhecidos, seu estudo exige um olhar diferenciado. Além disso, os mecanismos envolvidos na susceptibilidade a PCM ainda não são totalmente conhecidos. Por isso, procuramos verificar se existe diferença na resposta a esses GSLs por células do sistema imune de indivíduos controles (pessoas sem histórico de PCM) ou indivíduos curados (indivíduos sabidamente susceptíveis, uma vez que não foram capazes de controlar a infecção no passado, mas atualmente não apresentam PCM ativa).

Neste estudo, dois GSLs foram extraídos da levedura de *P. brasiliensis*, da linhagem PS2, espécie encontrada no Brasil e Venezuela, cepa Pb-18: CMH com característica neutra, formado por uma ceramida ligada a uma glucose (TAKAHASHI et al., 1996); e GIPC, molécula ácida composta principalmente por um fosfoinositol-ceramida ligado a 2 manoses e 1 galactofuranose (LEVERY et al., 1998). Cabe ressaltar que foram reconhecidas recentemente pelo menos três diferentes espécies filogenéticas que correspondem a *P. brasiliensis*, distribuídas pelo território da América Latina (MATUTE et al., 2006) e que poderiam apresentar diferenças quanto à sua composição de membrana. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que esses GSLs possuem a capacidade de modular funções de células do sistema imune, provavelmente por mecanismos distintos, embora estes mecanismos não tenham sido detalhados. Assim, algumas hipóteses foram propostas, porém os mecanismos de muitas das alterações causadas pelos GSLs permanecem inexplicados e representem uma área de estudos que necessita ser explorada. Outra observação importante foi a de que, em diversos ensaios, a resposta inata e adaptativa de indivíduos controles e curados frente aos GSLs foram diferenciadas.

A dose de CMH no qual ocorreu o efeito máximo de linfoproliferação após estímulo com PHA foi de 50 μ M, que corresponde a aproximadamente 40 μ g/mL. A partir do número de fungos iniciais e o rendimento obtido após a extração dos GSLs, chegou-se a uma estimativa de que essa dosagem corresponde à quantidade de GSL presente em 200×10^6 fungos/mL, cultivados sempre com 2×10^6 células/mL (PBMCs ou monócitos), assim, uma estimativa de 100 fungos/célula. Embora a primeira vista esta proporção pareça elevada, estudos com GSL e resposta imune empregam doses ainda superiores, como por exemplo, no trabalho de Gavella, Kveder e Lipovac (2010), no qual um gangliosídeo de peso molecular aproximado de 1500g/mol é utilizado na concentração de 100 μ M. Em um estudo envolvendo GSLs extraídos de *Leishmania*

amazonensis, foram utilizadas concentrações de 5 a 50 μM (GIORGIO et al., 2003) e de GSLs extraídos de *T. cruzi* e macrófagos humanos foram empregadas diversas doses, variando de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (BRODSKYN et al., 2002), demonstrando que as concentrações de GSL utilizadas no nosso trabalho são comparáveis às de outros estudos na área.

O mecanismo da ação dos GSLs exógenos sobre as células não foi determinado neste trabalho, mas sabe-se que quando administrados, estes podem ser incorporados às membranas, alterando sua composição (SAQR; PEARL; YATES, 1993; SCHWARZMANN, 2001; SIMONS et al., 1999). As membranas celulares são estruturas estáveis, porém seus componentes têm certo grau de mobilidade lateral (fluidez). Existem, porém regiões ricas em GSLs, com mobilidade reduzida e composição diferenciada. Os GSLs, devido a suas cadeias de ceramida hidrofóbicas cuja estrutura é planar e relativamente rígida, se acomodam entre si de uma forma mais compacta, segregando-os dos fosfolipídios, principais componentes da membrana (PRINETTI et al., 2009). Além disso, os grupamentos polares na região glicídica e da cadeia de esfingosina conferem aos GSLs a capacidade de formar pontes de hidrogênio, estabilizando o complexo e segregando-o do restante da membrana (PASCHER, 1976; STANCEVIC; KOLESNICK, 2010), criando um segundo nível de organização dentro das membranas. Nesses microdomínios (*lipid rafts*) pode ocorrer o confinamento de proteínas, favorecendo a interação entre aquelas presas nos mesmos microdomínios e prevenindo a interação com proteínas em diferentes regiões. A adição de GSLs exógenos reduz a fluidez original das membranas (BERTOLI et al., 1981) e a associação de uma proteína numa região de menor fluidez pode restringir o deslocamento lateral da proteína, favorecendo ligações mais estáveis com outras moléculas. Além disso, regiões rígidas de membrana podem induzir mudanças conformacionais, afetando a atividade da proteína, ou ainda podem ocorrer interações químicas das proteínas com a cabeça polar das moléculas de GSLs (LEVADE; JAFFREZOU, 1999; PRINETTI et al., 2009). Análises em *rafts* de membrana mostraram que muitas proteínas como tirosinas quinases da família Src, proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) e proteínas adaptadoras estão concentradas em *rafts* (SIMONS, TOOMRE, 2000) e, por isso, estas estruturas apresentam um efeito biológico. O complexo TCR - CD3 é fracamente associado à *rafts* de membrana quando a célula está em repouso, porém essa associação aumenta significativamente após

ativação celular (MONTIXI et al., 1998). O complexo é deslocado para próximo de proteínas quinases residentes nesses *rafts*, tais como as proteínas da família Src (KOSUGI et al., 2001; TAVANO et al., 2004, YASUDA et al., 2000), facilitando a fosforilação de proteínas adaptadoras. Foi sugerida uma correlação entre altas concentrações de GSL em linfócitos T de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e uma maior resposta à ativação celular (JURY et al., 2004; KRISHNAN et al., 2004). Outros trabalhos mostram que o tratamento de células T com um inibidor de glucosilceramida sintase, responsável pela síntese de GSL, reduziu a concentração dessa molécula em *rafts* de membrana, atenuou a sinalização via TCR e ativação das células, bem como a produção de IFN- γ (BLANK et al., 2005) além de alterar o perfil de resposta efetora de células T CD4 (ZHU et al., 2011).

Nossos resultados após a adição de CMH em culturas de PBMC de indivíduos controles mostraram uma elevação da resposta linfo-proliferativa induzida por PHA. Por outro lado, o outro GSL testado, GIPC, não foi capaz de interferir na linfoproliferação em nenhum dos grupos, demonstrando que este efeito é específico de CMH. Uma possível explicação é que CMH exógeno possa ter sido incorporado a *rafts* de membrana dos linfócitos, aumentando sua concentração nessas regiões e potencializado a sinalização de linfoproliferação. De forma contrária, foi descrito que GSLs neutros extraídos de *Leishmania amazonensis* inibem a resposta proliferativa estimulada com PHA (GIORGIO et al., 2003). Essa divergência de resultados sugere que GSLs extraídos de diferentes micro-organismos podem apresentar características funcionais distintas. Especificamente no grupo curado não houve aumento de proliferação dos linfócitos em presença de CMH, levantando a hipótese de uma regulação negativa presente neste grupo, provavelmente decorrente do aumento de IL-10, discutido mais adiante.

Outro fator que pode ter contribuído para o aumento de resposta proliferativa induzida por PHA na presença de CMH em linfócitos do grupo controle foi o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras nos monócitos causado por esse GSL. CD80 e CD86 são as principais moléculas co-estimuladoras presentes em células apresentadoras de antígenos. Estas moléculas são responsáveis pelo segundo sinal para ativação das células T e são necessárias para garantir a ativação das células e impedir anergia, pois sinalizam que o antígeno está sendo apresentado num contexto inflamatório. CD80 e CD86 se ligam a receptores da família CD28 em células T, sendo

que a ação dessas moléculas vai depender essencialmente do receptor no qual ocorreu a ligação. O receptor CD28 é um receptor com atividade estimulatória e sua ligação resulta em expansão clonal e produção de IL-2. O aumento de CD80 e CD86, causado por CMH, pode ter contribuído para o aumento de proliferação que ocorreu no grupo controle após ativação com PHA. Já CD152, outro membro da família CD28, é um receptor que desencadeia sinais inibitórios após ligação ao CD80 ou CD86 (LINSLEY et al., 1994). Sua ação pode ocorrer tanto pela competição com a molécula CD28 pela ligação a CD80 e CD86, mas também pela indução de sinais negativos nos linfócitos T por ativação de fosfatases, resultando na redução de IL-2 e outras citocinas pró-inflamatórias, no bloqueio da entrada da célula T no ciclo celular e proliferação ou ainda desencadeamento de apoptose (WING; YAMAGUCHI; SAKAGUCHI, 2011). Uma citocina que pode aumentar a expressão desse receptor é IL-10 (YE et al., 2007), a qual encontrou-se aumentada especificamente no grupo curado. Embora IL-10 tenha sido dosada em culturas puras de monócitos, não em culturas de PBMCs, é provável que IL-10 estivesse aumentada também nestas culturas. Possivelmente, uma maior expressão de CD152 nos linfócitos, induzida por IL-10, pode ter contribuído para uma resposta negativa frente ao aumento de CD80 e CD86 causada por CMH, somente no grupo curado. Trabalhos do nosso grupo já haviam demonstrado um aumento na expressão de CD152 em pacientes com a forma ativa da doença (CACERE et al., 2008) entretanto indivíduos curados e indivíduos sem histórico da doença ainda precisam ser analisados.

PHA é uma lectina que se liga a certas glicoproteínas de superfície de células T, incluindo o TCR e a molécula CD3 (ABBAS et al., 2005) causando ativação celular policlonal. A ligação ao CD3 resulta em sinalização intracelular, proliferação e produção de citocinas. O sinal inicial desencadeia a ativação de diversas cascatas com componentes moleculares distintos, como as vias de ativação de ERK, JNK, NFAT ou PKC. Essas vias podem ser moduladas de forma independente, sendo que a proliferação celular não necessariamente é acompanhada de diferenciação dos linfócitos T em Th1 ou Th2. No trabalho de Giorgio et al. (2003) demonstrou-se que um GSL neutro, assim como CMH, extraído de *Leishmania amazonensis*, é capaz de inibir PKCs e consequentemente reduzir a geração de NF- κ B ativo. Entretanto, ainda não se sabe se GSLs podem modular a ação de proteínas de outras vias de sinalização intracelular. Esta hipótese poderia explicar porque no nosso trabalho, CMH promoveu aumento de

proliferação celular mesmo sem favorecer a diferenciação das células para Th-1 ou Th-2, pois não houve modulação da produção de IFN- γ . Entretanto, a diferenciação para outros tipos celulares, como Th-17 ou Treg não foi avaliada. IL-2 também apresentou uma concentração semelhante nas culturas de PHA e PHA + CMH, sendo que nesta última a proliferação celular foi elevada. Neste caso, uma das explicações seria o consumo desta citocina nas células das culturas com PHA + CMH, reduzindo sua concentração para os níveis observados nas culturas com PHA. Já no grupo curado houve redução na produção de IL-2 e IFN- γ sem alteração na resposta linfoproliferativa. Novamente, o aumento de IL-10 e possivelmente também de expressão de CD152, explicaria porque houve, especificamente no grupo curado, bloqueio do aumento da resposta proliferativa causado por CMH em culturas com PHA observado no grupo controle. Esse bloqueio se associou a uma redução da produção de IFN- γ e IL-2.

Enquanto o mitógeno PHA não requer a apresentação de antígenos por APCs, a linfoproliferação frente a antígenos resulta da apresentação destes pelas APCs, da ligação da molécula apresentadora de antígeno ao TCR do linfócito, além da ligação de moléculas co-estimuladoras das APCs, tais como CD80, CD86 e CD40 aos seus ligantes nos linfócitos. Não só o complexo TCR mas também a molécula de MHC-II está associada a *rafts* de membrana e pode ter sua função modulada por alterações nessas estruturas de membrana (ANDERSON; HILTBOLD; ROCHE, 2000). Já foi demonstrado que a infecção por *Leishmania donovani* altera a composição de membrana, desfragmentando *rafts* e causando anergia por prejudicar apresentação de antígenos (PINHEIRO et al., 2004). O aumento de fluidez de membrana que ocorre na infecção por *Leishmania donovani* reduz a ligação do peptídeo fagocitado ao complexo MHC-II e a fusão do fagossomo ao lisossomo (PETERS; SACKS, 2006). A adição de GSLs exógenos e um consequente aumento na rigidez da membrana pode ainda afetar a endocitose de antígenos (KASAHARA; SANAI, 1999). Entretanto, no nosso trabalho, ao contrário do observado com PHA, não houve alteração induzida por CMH na proliferação em culturas com antígenos (CMA) no grupo controle. Embora CMH elevasse a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 nos monócitos, não houve um aumento significativo na expressão de HLA-DR, molécula apresentadora de antígeno necessária para induzir a linfoproliferação em culturas com antígeno. No grupo curado houve redução significativa da linfoproliferação em resposta a CMA e gp43, mesmo com o aumento de CD80 e CD86 causado por CMH e sem alteração na

expressão de HLA-DR em relação às células cultivadas sem CMH. Da mesma forma que nas culturas com PHA, neste grupo, a resposta ao CMH foi mais inibitória que a resposta do grupo controle e novamente, IL-10 possivelmente causando a indução de CD152, poderia ser responsável por esse efeito.

Esses dados em conjunto sugerem que no grupo curado pode estar ocorrendo um efeito anti-inflamatório decorrente de IL-10. Nosso grupo já havia demonstrado que monócitos de pacientes com a forma ativa de PCM eram a principal fonte de IL-10 em culturas com PBMC estimuladas com gp43 (BENARD et al., 2001), entretanto em indivíduos curados isso não havia sido determinado. Outro trabalho, envolvendo indivíduos saudáveis curados, recrutados utilizando os mesmos critérios de inclusão de pacientes que os utilizados neste trabalho, apresentavam uma redução na produção de IL-12 em comparação a indivíduos resistentes (PCC+) e foi levantada a hipótese de que isso seria decorrente, provavelmente, de um aumento na produção de IL-10 em PBMCs (ROMANO et al, 2005). Corroborando tais dados, no presente trabalho mostramos um aumento na produção de IL-10 por APCs, tanto monócitos quanto células dendríticas nas amostras do grupo curado. Esses dados chamam a atenção, pois não havia PCM ativa no momento da coleta de sangue, visto que os indivíduos foram curados de PCM há vários anos. Isso descarta a possibilidade de uma desregulação na produção de citocinas causada pela infecção, mas sim um desbalanço na produção de IL-10 que ocorre no início da resposta imune, ainda no componente inato. Este aumento ocorreria mesmo na ausência de infecções e pode ter favorecido um posterior desvio da resposta adaptativa em favor de Th-2 e o estabelecimento da PCM no passado nestes indivíduos. IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias. Foi descrito que IL-10 leva a uma diminuição de produção de NO e H₂O₂ em macrófagos (MOREIRA et al., 2010) e na expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 (HAWRYLOWICZ; GARRA, 2005; MITRA et al., 1995; YE et al., 2007) e dectina-1 (WILLMENT et al., 2003) em APCs. Como verificado nas tabelas 2 e 3, nos monócitos e células dendríticas dos indivíduos curados houve redução na expressão destas moléculas em relação aos indivíduos controles, corroborando com a hipótese de que IL-10 poderia estar causando um efeito inibitório nas APCs do grupo curado.

O aumento da expressão de CD80, CD86 em monócitos na presença de CMH foi similar em ambos os grupos e ocorreu sem que fossem empregados agonistas exógenos, como LPS, para induzir regulação dessas moléculas. O aumento das

moléculas co-estimuladoras não ocorreu por indução de linfócitos T ativados via CD40 – CD40L, uma vez que foram avaliadas culturas puras de monócitos. Esse efeito foi específico de CMH, uma vez que GIPC, nas mesmas condições, não alterou a expressão dessas moléculas. Embora a possibilidade de CMH estar sendo reconhecido por algum PRR não possa ser totalmente descartada, já que neste trabalho não foram feitos ensaios específicos para avaliar a ligação com PRR, nossa hipótese é de que CMH seja capaz de modular a função de células previamente ativadas, mas não de levar a ativação celular. O aumento na expressão de CD80 e CD86 foi discreto, embora significativo, e a produção de TNF- α e IL-10 não foi modulada por CMH, o que seria característico de uma ativação através de PRRs (KAWAI; AKIRA, 2010). A própria adesão dos monócitos à placa de cultivo ou ainda o uso de *beads* acopladas ao CD14 provavelmente causou ativação celular prévia, sendo este o possível mecanismo disparador de ativação, e não a ligação do CMH a um PRR. O estado ativado das células pode ser comprovado pela grande produção de TNF- α detectadas em sobrenadante de cultura mesmo sem estímulo exógeno, em todas as condições experimentais. Neste sentido, já foi demonstrado que glicofosfolipídios de *Leishmania* sp modulam a expressão de moléculas co-estimuladoras induzidas por LPS na superfície de APCs (BRODSKYN et al., 2002). No nosso trabalho, CMH modulou a expressão de CD80 e CD86, que poderia ter ocorrido tanto pela regulação positiva dessas moléculas como pela inibição da sua endocitose e retenção destes na superfície. Assim, embora CMH isoladamente não seja capaz de ativar diretamente os monócitos, em células previamente ativadas CMH elevaria a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86.

Como esperado, a maturação das células dendríticas resultou no aumento da expressão de CD83, CD80 e CD86, além de TLR4, em relação às células dendríticas imaturas de ambos os grupos, controle e curado. Nos dois grupos CMH diminuiu a capacidade de células dendríticas em induzir linfoproliferação, demonstrado pela redução de proliferação de linfócitos autólogos cultivados com células dendríticas ativadas na presença de CMH. Não houve queda significativa na expressão de HLA-DR ou de moléculas co-estimuladoras que justificariam essa inibição na resposta proliferativa. Ao contrário, em células do grupo curado houve um aumento significativo no número de células expressando CD86. O efeito inibitório de CMH sobre a indução de linfoproliferação pode ter ocorrido devido ao protocolo utilizado. As culturas de

células dendríticas foram realizadas com 2×10^5 células dendríticas /mL, diferente das outras culturas, nas quais foram utilizadas 2×10^6 células /mL. Assim, células dendríticas foram expostas a um número dez vezes maior de moléculas de GSL que a das células nos experimentos para determinar a expressão de moléculas de superfície. Não havia diferenças morfológicas nas células dendríticas maduras cultivadas ou não com CMH quando estas eram observadas em microscópio óptico que sugerissem morte celular pelo GSL. Nossa hipótese é de que células expostas a um número maior de moléculas de GSLs, ao invés de promover a compactação de *rafts*, poderia causar a desestabilização e fragmentação destes para a geração de mais e menores unidades de *rafts*, dessa forma, afastando proteínas necessárias para a indução de linfoproliferação. Já foi demonstrado que a fragmentação de *lipid rafts* em APCs prejudica a sinalização para o TCR em células T (CHAKRABORTY et al., 2005)

Um dado interessante foi o aumento na expressão de dectina-1 nas células dendríticas tratadas com CMH, principalmente no grupo curado, embora tenha havido também uma forte tendência no grupo controle ($p = 0,06$). A dectina-1 é um receptor de β -glucanas (polímeros de glucose), o que sugere que CMH, que contém apenas uma glucose em sua estrutura, não seja um ligante deste receptor e que a regulação da sua expressão ocorreu por mecanismos independentes de sua ativação. Este receptor, expresso em monócitos / macrófagos, neutrófilos e células dendríticas e em menor proporção em linfócitos T (TAYLOR et al., 2002), é importante para o reconhecimento de *P. brasiliensis* (BONFIM; MAMONI; BLOTTA, 2009), e está envolvido na fagocitose e no desencadeamento de resposta oxidativa a fungos (TAYLOR et al., 2007). Além disso, sua ativação em células dendríticas resulta no direcionamento da resposta imune para Th1, com produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009). Associado ao aumento de dectina-1, evento que poderia favorecer o direcionamento de células para Th1 em resposta a *P. brasiliensis*, CMH reduziu a produção de IL-10 no grupo curado, o que se associou a um aumento na produção de IL-12p40, especificamente neste grupo, restabelecendo no grupo curado o padrão de citocinas observado no grupo controle. No grupo controle essas citocinas não foram moduladas, divergindo dos resultados anteriores nos quais o grupo curado apresentava sempre um padrão de resposta menos inflamatório. Isso pode ter ocorrido devido ao coquetel de citocinas usado para maturação das células dendríticas. Embora no grupo curado exista um aumento de produção de IL-10 (figura

20), as três citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) adicionadas para a maturação podem ter suprimido o efeito inibitório da IL-10 nestas células. Este protocolo de maturação é o mais comumente empregado no estudo de células dendríticas para imunoterapia, numa tentativa de recriar o ambiente inflamatório em diversos tipos de infecção (CASTIELLO et al., 2011). Isso evidencia a dificuldade de se trabalhar com células transformadas *in vitro*, pois estas nem sempre representam as condições existentes *in vivo*.

O outro GSL extraído de *P. brasiliensis* analisado foi GIPC. A proporção relativa de cada GSL nos fungos ainda permanece desconhecida, porém acredita-se que GIPC esteja presente em maior quantidade mas sua extração seja relativamente mais difícil que de CMH (WARNECKE; HEINZ, 2003). Embora GIPC não tenha alterado linfoproliferação, a dose que determinamos para os demais experimentos foi de 25 μ M, ou 40 μ g/mL. Isso se justifica pelo fato de que as moléculas de Pb2 e Pb3, componentes do GIPC, possuem um tamanho aproximadamente 2 vezes maior que a de CMH. Nesta concentração, houve um discreto aumento de proliferação em alguns indivíduos testados, embora não significativo, porém, esse GSL teve a capacidade de elevar a síntese de IL-2 e IFN- γ , demonstrando uma diferenciação das células em favor de Th1. Dados da literatura mostram que certos gangliosídeos liberados por células tumorais são capazes de inibir a produção de IFN- γ por células T helper, sem que isso seja acompanhado de um prejuízo na ativação da célula T, uma vez que havia uma expressão equivalente de CD69 nos linfócitos T nos grupos tratados e não tratado por esse gangliosídeo (JALES et al., 2010). Com isso, ocorreria uma modulação da resposta efetora das células T helper, sem necessariamente ocorrer alteração de proliferação. No nosso trabalho, as células do grupo controle, mas não do grupo curado, apresentaram essa regulação em favor de Th1. Isto pode eventualmente ser explicado também pelo aumento de IL-10 no grupo curado, o qual estaria inibindo o aumento da produção de IL-2 e IFN- γ no grupo curado. Como comentado para o CMH, esses dados sugerem que a regulação causada pelos GSLs nos linfócitos seja restrita a determinadas vias intracelulares de ativação. Da mesma forma, possivelmente o GIPC também estaria sendo inserido a *rafts* de membrana, entretanto, sua cabeça polar maior favoreceria interações químicas com as proteínas de membrana (STANCEVIC; KOLESNICK, 2010), podendo assim interferir de maneira distinta do que ocorre com CMH.

Os grupos controle e curado apresentaram capacidades fagocíticas de leveduras do *P. brasiliensis* semelhantes, porém apenas no grupo controle houve aumento nesta atividade em decorrência da presença de GIPC. A fagocitose é disparada por diferentes receptores de superfície dos fagócitos, porém a alteração na fagocitose ocorreu em vias disparadas por receptores independentes de opsoninas, sendo a dectina-1 o mais importante deles nas infecções fúngicas (JOZEFOWSKI, 2012). Embora sua expressão não tenha sido aumentada nos macrófagos, dectina-1 é um receptor acoplado a *rafts* de membrana e sua ativação é dependente dessas estruturas (XU et al., 2009), podendo dessa forma ter sua atividade modulada por alterações na composição dos *rafts* ao qual estão inseridos. Produtos de degradação de esfingolipídios também já foram implicados em regulação de fagocitose. Foi demonstrado que o acúmulo de esfingosina nos monócitos reduz fagocitose de células apoptóticas em modelo de inflamação crônica pulmonar (PETRUSCA et al., 2010). Este efeito ocorreria pela modulação da atividade família de enzimas Rho GTPases envolvidas na reorganização do cito-esqueleto e projeção de membrana (RIDLEY, 2001), necessárias para a fagocitose. Ceramida, outro metabólito dos esfingolipídios, ativa a proteína RhoA, facilitando assim a translocação desta proteína para a membrana, processo que resulta na polimerização de fibras de actina (HANNA et al., 2001). O aumento na fagocitose pela incubação com GIPC ocorreu apenas no grupo controle. GIPC poderia facilitar a fagocitose do fungo durante a resposta imune e a ausência de resposta dos indivíduos curados a esta molécula poderia representar um mecanismo que contribuiria para a susceptibilidade à infecção. Enquanto em modelo animal já foi demonstrado que existem outros componentes moleculares capazes de inibir a fagocitose do fungo, como gp43 (POPI; LOPES; MARIANO, 2002), na infecção humana GIPC do fungo poderia contribuir como uma molécula ativadora da fagocitose nos indivíduos controles, porém não nos curados. Assim, o efeito final dependeria da soma dos diversos sinais disparados pelo *P. brasiliensis*, além das características do hospedeiro, determinantes da susceptibilidade ou resistência. Além disso, o aumento de fagocitose não indica, necessariamente, uma melhor capacidade de resposta contra o fungo, uma vez que a fagocitose, sem a morte do fungo, pode representar um mecanismo de carreamento e disseminação do patógeno (BENARD, 2008). Foram realizados diversos ensaios para determinar a produção de NO e H₂O₂, pela reação com o reagente de Griess (BONATTO et al., 2004) e pelo método de Pick e Mizel (1981), respectivamente. Não foi possível detectar nenhum dos

metabólitos acima do limiar de detecção determinado para cada método. Técnicas de biologia molecular poderiam ser posteriormente utilizadas para solucionar tais questões. A contagem de CFU após a fagocitose também representa uma metodologia que poderia ser empregada em próximos experimentos.

GIPC teve um efeito inibitório sobre a maturação de células dendríticas nas células do grupo controle. Isso foi evidenciado pela redução na expressão de CD83, CD80 e CD86 causada por GIPC em relação às células dendríticas maduras e uma tendência de redução na expressão de HLA-DR ($p = 0,06$). Já foi demonstrado em modelo animal que a fagocitose do fungo *P. brasiliensis* leva à redução na expressão de HLA-DR, CD86, CD80 e CD40 (FERREIRA, ALMEIDA, 2006; FERREIRA; LOPES; ALMEIDA, 2004) e GIPC pode ser um dos componentes do fungo responsável por essa alteração. GIPC poderia contribuir como um mecanismo de escape para o fungo uma vez que as células dendríticas imaturas são mais especializadas na fagocitose e só depois da maturação adquirem capacidade de apresentação de antígeno. Assim, a levedura passaria a se localizar intracelularmente, facilitando sua proliferação, porém a indução de imunidade adaptativa estaria prejudicada. Não houve alterações na produção de IL-10 ou IL-12p40 neste grupo. Gangliosídeos liberados por certos tumores também apresentam capacidade de inibir a maturação de células dendríticas, um mecanismo que contribuiria para a inibição da resposta imune anti-tumoral (SHEN; LADISCH, 2002). Estes mesmos autores mostraram que em cultura de células dendríticas imaturas um gangliosídeo tumoral reduz a capacidade de ativar NF- κ B em resposta ao LPS, com isso inibindo a expressão de CD40, CD80, CD86, CD83 e HLA-DR nas células dendríticas maduras. Com relação aos nossos resultados referentes ao grupo curado, apesar da redução na expressão de CD80, não houve diferença significativa no grau de maturação das células dendríticas maduras na presença ou não de GIPC, embora, como verificado no grupo controle, GIPC apresente um caráter inibitório sobre a maturação das células dendríticas. Entretanto, isso não significa que GIPC não esteja modulando a expressão de HLA-DR, CD80, D86 e dectina-1. Como já mencionado, IL-10 tem a capacidade de reduzir a expressão de dectina-1, CD80, CD86, HLA-DR (HAWRYLOWICZ, GARRA, 2005; MITRA et al., 1995; WILLMENT et al., 2003) o que foi observado nas células dendríticas maduras do grupo curado (tabela 5). GIPC foi capaz de reduzir a produção desta citocina por células dendríticas no grupo curado. Assim, a ação inibitória sobre a maturação das células dendríticas que ocorre pelo GIPC seria, possivelmente,

compensada neste grupo pela redução de IL-10 também causada por GIPC. Dessa forma, a expressão das moléculas HLA-DR, CD80, D86 e dectina-1 no grupo controle com GIPC se assemelha à expressão nas células do grupo controle tratadas com GIPC (tabela 5). No mesmo trabalho de Shen e Ladisch (2002) foi demonstrado que gangliosídeos também são capazes de alterar secreção de citocinas por células dendríticas em modelo de maturação induzida por LPS. No nosso trabalho, para a maturação de células dendríticas, diferentes vias de sinalização foram ativadas por IL1 β , IL-6 e TNF- α . GIPC poderia estar interferindo em pelo menos um dos diversos sinais disparados por estas citocinas, reduzindo a maturação destas células. Quanto à capacidade de induzir linfoproliferação, as células dendríticas cultivadas com GIPC exerceram atividade inibitória, em ambos os grupos. Da mesma forma que comentado para o CMH, provavelmente esse efeito se deve ao cultivo das células dendríticas imaturas com doses relativamente maiores de GIPC quando levada em conta a relação células dendríticas: número de moléculas de GSL adicionadas.

Deve-se levar em conta que nos pacientes infectados, GSLs do fungo não estão presentes na forma livre, como ocorre nos estudos *in vitro*. *In vivo*, GSL presentes nas membranas do fungo interagem com as células do hospedeiro por meio de vesículas secretadas pelo fungo contendo esses GSLs. A fusão dessas vesículas poderia causar inserção dos GSLs do fungo na membrana das células do indivíduo infectado. Outra via de incorporação dos GSLs do fungo ocorreria após a adesão ou fagocitose por células epiteliais, polimorfonucleares ou macrófagos fagocitose destes. Após a degradação nos fagolisossomos, os GSL liberados, devido a sua característica anfipática, seriam rapidamente inseridos às membranas desta organela, direcionadas para o complexo de Golgi, diretamente para as membranas plasmáticas (SANDHOFF; KLEIN, 1994) ou então degradadas. O contínuo e dinâmico tráfego de vesículas e síntese de membrana propiciaria a inserção dos GSLs em diferentes compartimentos celulares. Assim, os efeitos *in vivo* dos GSL do *P. brasiliensis* ainda precisam ser elucidados e estudos adicionais são necessários para o entendimento de todos os aspectos da relação *P. brasiliensis* – hospedeiro, especialmente em relação à participação de componentes lipídicos do fungo.

Outro tipo celular avaliado neste trabalho foram as células iNKT. Esse tipo celular chama a atenção por sua capacidade de produzir rapidamente tanto citocinas Th1

quanto Th2 e com isso modular a resposta imune adaptativa. No caso da infecção por *P. brasiliensis*, na qual a regulação fina de citocinas e o direcionamento em favor de Th1 é essencial para a resolução da infecção, estas células poderiam estar desempenhando um papel importante. Embora não haja estudos sobre sua participação na imunidade contra *P. brasiliensis*, um prejuízo na função dessas células poderia contribuir para a susceptibilidade à infecção. Por isso, procuramos verificar a capacidade de células iNKT de indivíduos curados, controles e controles PCC+ em proliferar e de produzir citocinas.

Nossos resultados demonstram que não há diferença entre os grupos no número de células iNKT circulantes ou pós expansão com α -GalCer, OCH e IGb3, seus agonistas com diferentes cadeias carbônicas e afinidades. Ao avaliarmos a funcionalidade das células dos três grupos, observamos que elas também apresentam o mesmo perfil de produção de citocinas no que se refere à IFN- γ , IL-4 e IL-10, quando ativadas com PMA e ionomicina ou o agonista α -GalCer. CD1d é uma molécula apresentadora de antígenos não convencional, que apresenta antígenos lipídicos ao invés de protéicos. A expressão dessa molécula também foi similar entre os grupos controle e curado, tanto em monócitos quanto células dendríticas e não foi modulada por CMH ou GIPC.

Mesmo com a ausência de diferenças na funcionalidade de células iNKT entre os grupos, não se pode descartar o papel destas células na PCM. A produção de outras citocinas ou ainda funções como a produção de granzima para lise de células não foram avaliados no nosso trabalho. Além disso, o desbalanço no padrão de citocinas é uma característica importante da PCM e sabe-se que células iNKT podem ser ativadas por citocinas, como IL-12 (BRIGL et al., 2011). Assim, essas células poderiam vir a desempenhar papéis distintos em indivíduos resistentes ou susceptíveis durante a infecção ativa, um papel que ainda precisa ser explorado.

6 CONCLUSÃO

De maneira geral, pode-se concluir que GSLs extraídos de leveduras de *P. brasiliensis* (cepa P-18) possuem um caráter imunomodulador. No grupo controle, CMH foi capaz de promover um aumento de linfoproliferação e de expressão de moléculas co-estimuladoras em monócitos. Entretanto não é possível afirmar se CMH possui um caráter inflamatório, pois em paralelo foi observada uma redução de produção de IFN- γ em culturas de PBMC com antígenos, sendo que esta é uma citocina essencial para ativação de imunidade celular direcionada para Th1. GIPC apresentou funções distintas dependendo do tipo celular, inibindo a maturação de células dendríticas e com isso, prejudicando a indução de resposta adaptativa, porém estimulando fagocitose em monócitos, evento essencial para a eliminação de *P. brasiliensis*. Por isso, não é possível ainda afirmar se os GSL do *P. brasiliensis* contribuem ou não como mecanismos de escape do fungo, porém este trabalho abre as portas para futuras análises mais detalhadas do papel modulador dessas moléculas em humanos. Futuramente, o estudo desses compostos e de seus mecanismos de ação possibilitaria o emprego destes como moléculas adjuvantes em tratamento, ou ainda, nos casos em que o GSL apresenta um efeito inibitório sobre a resposta imune, o bloqueio destes compostos com anticorpos monoclonais também poderia ser uma ferramenta útil. A necessidade de elucidar os mecanismos de ação dos GSLs toma uma magnitude ainda maior quando observamos que os efeitos dos mesmos GSLs sobre indivíduos susceptíveis, os principais interessados quando o assunto é tratamento, são diferentes dos efeitos em indivíduos do grupo controle. Neste trabalho também verificamos que células iNKT de indivíduos controles e curados apresentam-se em mesmo número e com a mesma capacidade de produção de citocinas, descartando a hipótese de que defeitos na expansão ou produção das citocinas avaliadas pudessem ser determinantes de susceptibilidade à PCM.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 589p.
- ABDI, K.; SINGH, N.; MATZINGER, P. T cell control of IL12p75 production. **Scand. J. Immunol.**, v. 64, p. 83 - 92, 2006.
- AEED, P. A.; YOUNG, C. L.; NAGIEC, M. M.; ELHAMMER, A. P. Inhibition of inositol phosphorylceramide synthase by the cyclic peptide aureobasidin A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 53, p. 496 -504, 2009.
- ALMEIDA, S. R.; MORAES, J. Z.; CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen- presenting cells. **Cell. Immunol.**, v. 190, p. 68 - 76, 1998.
- ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 529 - 537, 2001.
- ANDERSON, H. A.; HILTBOLD, E. M.; ROCHE, P. A. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 156 - 162, 2000.
- ARISTIZABAL, B. H.; CLMEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological Transition of *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia to Yeast Cells: *In Vivo* Inhibition in Females. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5587 – 5591, 1998.
- BAGNAT, M.; KERANEN, A.; SCHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 3254 - 3259, 2000.
- BAIDA, H. **Importância das células dendríticas na resposta imune celular de pacientes com paracoccidioomicose**. 104 f. 2007. Dissertação (Mestrado em dermatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BARROZO, L. V.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; BENARD, G.; SIQUEIRA-SILVA, M. E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int. J. Epidemiol.**, v.38, p. 1642 - 1649, 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTON, G. M.; MEDZITOV, R. Toll-like receptors and their ligands. **Curr Top. Microbiol. Immunol.**, v. 27, p. 81 - 92, 2002.

BATISTA, V. G. **Efeito de glicolipídios de *Paracoccidioides brasiliensis* sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose.** 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BENARD, G.; HONG, M. A.; DEL NEGRO, G. M. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; DUARTE, A. J. S. Antigen specific immunosuppression in Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 7-12, 1996.

BENARD, G.; ROMANO, C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S. Imbalance of IL-2, IFN-gama and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248 - 252, 2001.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209 - 221, 2008.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The Biology of NKT Cells. **Annu. Rev. Immunol.** v. 25, p. 297 – 336, 2007.

BEHAR, S. M.; DASCHER, C. C.; GRUSBY, M. J.; WANG, C. R.; BRENNER, M. B. Susceptibility of mice deficient in CD1d or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1973 – 1980, 1999.

BERTINI, S.; COLOMBO, A. L.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Expression of antibodies directed to *Paracoccideioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of Paracoccidioidomycosis treatment. **Clin. Vaccine immunol.**, v. 14, p. 150-156, 2007.

BERTOLI, E.; MASSERINI, M.; SONNINO, S.; GHIDONI, R.; CESTARO, B.; TETTAMANTI, G. Electron paramagnetic resonance studies on the fluidity and surface dynamics of egg phosphatidylcholine vesicles containing gangliosides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 507, p. 196 - 202, 1981.

BERZINS, S. P.; SMYTH, M. J.; BAXTER, A. G. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 131 – 142, 2011.

BLANK, N.; SCHILLER, M.; GABLER, C.; KALDEN, J. R.; LORENZ, H. M. Inhibition of sphingolipid synthesis impairs cellular activation, cytokine production and proliferation in human lymphocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 126 – 135, 2005.

BONATTO, S. J. R., FOLADOR, A., AIKAWA, J., YAMAZAKI, R. K., PIZATTO, N., OLIVEIRA, H. H. P. O., VECCHI, R., CURI, R., CALDER, P. C., FERNANDES, L. C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell Immunol.**, v. 231, p. 56 - 62, 2004.

BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. S. L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 722 – 733, 2009.

BRIGL, M.; BRENNER, M. B. CD1d: antigen presentation and T cell function. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 817 – 890, 2004.

BRIGL, M.; TATITURI, R. V.; WATTS, G. F. M.; BHOWRUTH, V.; LEADBETTER, E. A.; BARTON, N.; COHEN, N. R.; HSU, F. F.; BESRA, G. S.; BRENNER, M. B. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. **J. Exp. Med.**, v. 208, p. 1163 – 1177, 2011.

BROAD INSTITUTE: *Paracoccidioides brasiliensis* database. Disponível em: <<http://www.broadinstitute.org>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

BRODSKYN, C.; PATRICIO, J.; OLIVEIRA, R.; LOBO, L.; ARNHOLDT, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3736 - 3743, 2002.

BROWN, G. D.; TAYLOR, P. R.; REID, D. M. et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. **J. Exp. Med.**, v.196, p. 407 – 412, 2002 .

BROWN, G. D. Dectin-1: A signaling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat. Rev. Immunol.** v. 6, p. 33 – 43, 2006.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect. Immunol.**, v. 57, p. 2289 - 2294, 1989.

BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defenses cells. In: FRANCO, M, SILVA-LACAZ, C., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G., et al. **Paracoccidioidomycosis**, Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 213 – 223.

BURLANDY-SOARES, L. C.; MAMONI, R. L.; SCHREIBER, A. Z. S.; BOLTITA, M. H. S. L. Expression of activation and cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes of patients with paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 48, p. 843 - 852, 2010.

CACERE, C. R.; ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 105, p. 215 - 222, 2002.

CACERE, C. R.; MENDES – GIANNINI, M. J.; FONTES, C. J.; KONO, A.; DUARTE, A. J., BENARD, G. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1 and I-COS on T-cells from paracoccidioidomycosis

patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. **Clin. Immunol.**, v. 129, p. 341 – 349, 2008.

CALICH, V. L. G.; KIPNIS, T. L.; MARIANO, M.; FAVA NETO, C.; DIAS DA SILVA, W. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin. Immunol. Immunophatol.**, v. 12, p. 20 -30, 1979.

CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; VAZ, C. A. C. PMN chemotactic factor produced by glass adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brit. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 57 - 65, 1985.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 31, p. 615 - 623, 1998.

CALICH, V. L. G.; COSTA, T. A.; FELONATO, M., ARRUDA, C., BERNARDINO, S., LOURES, F. V., RIBEIRO, L. R. R., VALENTE-FERREIRA, R. C., PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, p. 223 - 236, 2008.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The use of cell-free-antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 31 - 38, 1991.

CAMPANELLI, A. P.; MARTINS, G. A.; SOUTO, J. T.; PEREIRA, M. S.; LIVONESI, M. C.; MARTINEZ, R., SILVA, J. S. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1496 - 1505, 2003.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M. Protective role of interferon-gamma in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immunol.**, v. 66, p. 800 - 806, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D. C.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Depletion of CD8+ T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immunol.**, v. 68, p. 352 – 359, 2000.

CARMO, J. P.; DIAS-MELÍCIO, L. A.; CALVI, S. A.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A. M. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 363 - 368, 2006.

CASTIELLO, L.; SABATINO, M.; JIN, P.; CLAYBERGER, C.; MARINCOLA, F. M.; KRENSKY, A. M.; STRONCEK, D.F. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, p. 457 – 466, 2011.

- CHACKERIAN, A.; ALT, J.; PERERA, V.; BEHAR, S. M. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6302 – 6309, 2002.
- CHAKRABORTY, D.; BANERJEE, S.; SEN, A.; BANERJEE, K. K.; DAS, P.; ROY, S. Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophages by disrupting lipid rafts. **J. Immunol.**, v. 175, p. 3214 – 3224, 2005.
- CHRISTIANSEN, D.; MILLAND, J.; MOUHTOURIS, E.; VAUGHAN, H.; PELLICCI, D. G.; McCONVILLE, M. J.; GODFREY, D. I.; SANDRIN, M. S. Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. **Plos. Biol.**, v. 6, e.172, 2008.
- CHU, J. W.; SHAROM, F. J. Gangliosides inhibit T-lymphocytes proliferation by preventing the interaction of interleukin-2 with its cell surface receptors. **Immunology**, v. 79, p. 10 – 17, 1993.
- CONNELL, T. D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of gangliosídeo binding in immunomodulation by type I and type II heat-labelli enterotoxins. **Expert Rev. Vaccines**, v. 6, p. 821 – 834, 2007.
- CORTE, A. C.; ITANO, E. M.; ONO, M. A.; CAMARGO, Z. P. Paracoccidioidomycosis infection in horses in the north Parana´ state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo**, v. 47, p. 42, 2005a. Apresentado no International Meeting of Paracoccidioidomycosis, 9., 2005, São Paulo.
- CORTE, A. C.; ITANO, E. N.; ONO, M. A.; MALANSKI, L. S.; NAVARRO, I. T.; SHIOZAWA, M. M.; SVOBODA, W. K.; AGUIAR, L. M.; PASSOS, F. C.; CAMARGO, Z. P. Paracoccidioidomycosis infection in free-living monkeys of northwest Parana´ state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo**, v. 47, p. 42, 2005b. Apresentado no International Meeting of Paracoccidioidomycosis, 9., 2005, São Paulo.
- CORTHAY, A. A three-cell model for T helper cell activation. **Scan. J. immunol.**, v. 64, p. 93 - 96, 2006.
- CRESPO, F. A.; SUN, X.; CRIPPS, J. G.; FERNANDEZ-BOTRAN, R. The imunoregulatory effects of gangliosides involve imune deviation favoring type-2 T cell response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, p. 586 - 595, 2006.
- CROTT, L. S., VALIM, Y. M., SILVA, C. L., BARBOSA, J. E. The role of the complement system in the neutrophil functions stimulated *in vitro* by an alkali-insoluble cell wall fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 17-27, 1993.
- DAS, T.; SA, G.; HILSTON, C.; KUDO, D.; RAYMAR, P.; BISWAS, K.; MOLTO, L.; BUKOWSKI, R.; RINI, B.; FINKE, J. H.; TANNENBAUM, C. GM1 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in renal cell carcinoma, synergize to induce T- cell apoptosis. **Cancer Res.**, v. 68, p. 2014 - 2023, 2008.

DIAS, M. F. R. G.; FILGUEIRA, A. L.; SOUZA, W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. **Microsc. Microanal.**, v. 10, p. 215 - 223, 2004.

FERNANDES, G. R.; DEPS, P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CAMARGO, Z. P. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 42, p. 363 – 368, 2004.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Regulation of T helper cell differentiation *in vivo* by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.**, v. 58, p. 290 - 297, 2003.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol. Lett.**, v. 94, p. 107 - 114, 2004.

FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Immunol. Lett.**, v. 103, p. 121 - 126, 2006.

FERREIRA, K. S.; BASTOS, K. R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S. R. 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.**, v. 196, p. 1108 – 1115, 2007.

FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. T. D.; SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H. S. L.; MAMONI, R. L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression 1 characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 4391 - 4401, 2010.

FISCHER, K.; SCOTET, E.; NIEMEYER, M.; KOEBERNICK, H.; ZERRAHN, J.; MAILLET, S.; HURWITZ, R.; KURSAR, M.; BONNEVILLE, M.; KAUFMANN, S. H. E.; SCHAIBLE, U. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. **Immunology**, v. 101, p. 10685 - 10690, 2004.

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

FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZZALLAH - WASSO, M.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v. 4, p. 18 – 196, 1989.

GAVELLA, M.; KVEDER, M.; LIPOVAC, V. Modulation of ROS production in human leukocytes by ganglioside micelles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43, p. 942 – 949, 2010.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungal targeted to sphingolipid synthesis: focus on inositol phosphorylceramide synthase. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 9, p. 1787 - 1796, 2000.

GIORGIO, S.; SANTOS, M. R. M.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K.; BERBIÉRI, C. L. Effects of glycosphingolipids purified from *Leishmania amazonensis* amastigotes on human peripheral lymphocytes. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 469 - 472, 2003.

GOFF, R. D.; GAO, Y.; MATTNER, J.; ZHOU, D.; YIN, N.; CANTU, C 3rd; TEYTON, L.; BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B Effects of lipid chain lengths in alpha-galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, p. 13602 – 13603, 2004.

GOMES, N. A.; PREVIATO, J. O.; ZINGALES, B.; MENDONCA - PREVIATO, L.; DOS REIS, G. A. Down-regulation of T-lymphocyte activation *in vitro* and *in vivo* induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanossoma cruzi*. Assignment of the T cell-suppressive determinat to the ceramide domain. **J. Immunol.**, v. 156, p. 628 - 635, 1996.

GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma-interferon- activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immunol.**, v. 68, p. 2546 - 2552, 2000.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. **Immunol. Rev.**, v. 230, p. 38 – 50, 2009.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, p. 927 – 930, 2002.

HANNA, A. N.; BERTHIAUME, L. G.; KIKUCHI, Y.; BEGG, D.; BOURGOIN, S.; BRINDLEY, D. N. Tumor necrosis factor-alpha induces stress fiber formation through ceramide production: role of sphingosine kinase. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 3618 - 3630, 2001.

HAWRYLOWICZ, C. M; O’GARRA, A. Potential role of interleukin- 10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nat. Rev. Immunol.**, v.5, p. 271 – 283, 2005.

HAYAKAWA, K.; TATEDA, K.; FUSE, E.T.; MATSUMOTO, T.; AKASAKA, Y.; ISHII, T.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; KAKU, M.; SATNDIFORD, T. J.; YAMAGUCHI, K. Paradoxically high resistance of natural killer T (NKT) cell-deficient mice to *Legionella pneumophila*: another aspect of NKT cells for modulation of host responses. **J. Med. Microbiol.**, v.57, p. 1340 – 1348, 2008.

JALES, A.; FALAHATI, R.; MARI, E.; STEMMY, E. J.; SHEN, W.; SOUTHAMMAKOSANE, C.; HERZOG, D.; LADISCH, S.; LEITENBERG, D. Ganglioside-exposed dendritic cells inhibit T-cell effector function by promoting regulatory cell activity. **Immunology**, v. 132, p. 134 - 143, 2010.

JOZEFOWSKI, S.; YANG, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KOBZIKINFLAMM, L. Scavenger receptors and b-glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. **Inflam. Res.** v. 61, p. 113 - 26, 2012.

JURY, E. C.; KABOURIDIS, P.S.; FLORES - BORJA, F.; MAGEED, R. A.; ISENBERG, D. A. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1176 – 1187, 2004.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, v.97, p. 1036 - 1041, 1969.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, v. 101, p. 675 - 680, 1970.

KARHAWI, A. S.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v. 38, p 225 - 229, 2000.

KARMAKAR, S.; PAUL, J.; DE, T. *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into *lipid rafts* in infected macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, p. 1376 - 1387, 2011.

KASAHARA, K.; SANAI, Y. Possible roles of glycosphingolipids in lipid rafts. **Biophys Chem.**, v. 82, p. 121 – 127, 1999.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.**, v.11, p. 373 – 384, 2010.

KAWAKAMI, K.; KINJO, Y.; YARA, S.; KOGUCHI, Y.; UEZU, K.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; SAITO, A. Activation of Valpha14+ natural killer T cells by α -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 213 -220, 2001.

KINJO, Y.; WU, D.; KIM, G.; XING, G. W.; POLES, M. A.; HO, D. D.; TSUJI, M.; KAWAHARA, K.; WONG, C. H.; KRONENBERG, M. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. **Nature**, v. 434, p. 520 – 555, 2005.

KOSUGI, A.; HAYASHI, F.; LIDDICOAT, D. R.; YASUDA, K.; SAITOH, S.; HAMAOKA, T. A pivotal role of cysteine 3 of Lck tyrosine kinase for localization to glycolipid-enriched microdomains and T cell activation. **Immunol. Lett.**, v.76, p. 133 – 138, 2001.

KRISHNAN, S.; NAMBIAR, M. P.; WARKE, V. G.; FISHER, C. U.; MITCHELL, J.; DELANEY, N.; TSOKOS, G. C. Alterations in lipid rafts composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v.172, p. 7821 – 7831, 2004.

KURITA, N., OARADA, M., ITO, E., MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 261-267, 1999a.

KURITA, N., BISWAS, S. K., OARADA, M., SANO, A., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.37, p. 19 – 24, 1999b.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., et al, **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 13 – 25.

LEVADE, T.; JAFFRÉZOU, J. P. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1438, p. 1 – 17, 1999.

LEVERY, S. B.; TOLEDO, M. S.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant beta-galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. **Biochemistry**, v. 24, p. 8764 – 8775, 1998.

LEVERY, S.B.; MOMANY, M.; LINDSEY, R.; TOLEDO, M.S.; SHAYMAN, J.A.; FULLER, M.; BROOKS, K.; DOONG, R.L.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc ceramide glucosyltransferase strongly affects germination, cell cycle and hyphal growth. **FEBS. Lett.**, v. 525, p. 59 – 64, 2002. Published erratum appears in: **FEBS Lett**, v. 526, p. 151, 2002.

LI, R.; VILLACRESES, N.; LADISCH, S. Human tumor gangliosides inhibit murine immune responses *in vivo*. **Cancer Res.**, v. 55, p. 211 -214, 1995.

LINSLEY, P. S.; GREENE, J. L.; BRADY, W.; BAJORATH, J.; LEDBETTER, J. A.; PEACH, R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v.1, p. 793 – 801, 1994.

LIPID LIBRARY. **Sphingolipids**. Disponível em: <<http://www.lipidlibrary.org>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

LONDERO, A. T. Epidemiologia. In: **Paracoccidioidomicose** (Blastomicose sul-americana). DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. São Paulo: Sarvier-Edusp, 1982. p. 85 – 90.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **J. Pneumol.**, v. 12, p. 41 - 60, 1986.

LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological

response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 80, p. 7659 - 7663, 1983.

MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, p. 20 – 29, 2005.

MATTNER, J.; DEBORD, K. L.; ISMALL, N.; GOFF, R. D.; CANTU, C.; ZHOU, D.; MEZARD, P. S.; WANG, V.; GAO, Y.; HOEBE, K.; SCHNEEWIND, O.; WALKER, D.; BEUTLER, B.; TEYTON, L.; SAVAGE, P. B.; BENDELAC, A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. **Nature**, v. 434, p. 525 - 529, 2005.

MATUTE, D. R.; McEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN – BLAS, G.; BAGALI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, p. 65 – 73, 2006.

MAZA, P. K.; STRAUSS, A. H.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; SUZUKI, E. Interaction of epithelial cell membrane rafts with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to fungal adhesion and SRC- family kinase activation. **Microb. Infect.**, v. 10, p. 540 - 547, 2008.

McEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.25, p. 165 -175, 1987.

MCKALLIP, R.; LI, R.; LADISCH, S. Tumor gangliosides inhibit the tumor- specific immune response. **J. Immunol.**, v. 163, p. 3718 - 3726, 1999.

MELLO, L. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; RODRIGUES, J. V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. **Hum. Immunol.**, v.63, p. 149 - 154, 2002.

MENDES-GIANNINI, M. J. S., BUENO, J. P., SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; MASUDA, A. Detection of the 43,000 – molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 1842 – 2845, 1989.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. M.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V.; FERREIRA, A. W. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p. 200 - 206, 1990.

MITRA, R. S.; JUDGE, T. A.; NESTLE, F. O.; TURKA, L. A.; NICKOLOFF, B. J. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10.

Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. **J. Immunol.**, v. 154, p. 2668 – 2677, 1995.

MOND, J. J.; WITHERSPOON, K.; YU, R. K.; PERERA, P. Y.; VOGEL, S. N. Inhibition of LPS-mediated cell activation *in vitro* and *in vivo* by gangliosides. **Circ. Shock.**, v. 44, p. 57 - 62, 1994.

MONTOYA, C. J.; CATAÑO, J. C.; RAMIREZ, Z.; RUGELES, M. T.; WILSON, S. B.; LANDAY, A. L. Invariant NKT cells from HIV-1 or *Mycobacterium tuberculosis* infected patients express an activated phenotype. **Clin. Immunol.**, v. 127, p. 1 -6, 2008.

MONTIXI, C.; LANGLET, C.; BERNARD, A. M.; THIMONIER, J.; DUBOIS, C.; WURBEL, M. A.; CHAUVIN, J. P.; PIERRES, M.; HE, H. T. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. **EMBO J.**, v.17, p. 5334 – 5348, 1998.

MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; PERAÇOLI, M. T. S.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M. V. C. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. **Mycopathologia**, v. 166, p. 17 - 23, 2008.

MOREIRA, A.P.; DIAS – MELÍCIO, L.A.; SOARES, A.M. Interleukin-10 but not transforming growth factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. **Cell. Immunol.**, v. 263, p. 196 – 203, 2010.

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

MUNK, M. E., KAJDACS-BALLA, A., DEL NEGRO, G., CUCE, L. C., DIAS DA SILVA, W. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 317 - 321, 1992.

MUSATTI, C. C.; REZKALLAH, M. T.; MENDES, E.; MENDES, N. F. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. **Cell Immunol.**, 24, p. 365 – 378, 1976.

NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M. Fungal glucosylceramides: from structural components to biologically active targets of new antimicrobials. **Front. Microbiol.**, v. 2, artigo 212, 2011.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIOORDANOU, P. M.; BLOTTA, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v.4, p. 139 -144, 2002.

ONO, M. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MORAIS, H. A. S.; TRAPP, S. M.; BELITARDO, D. R. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 277 – 282, 2001.

PAGLIARI, C.; PEREIRA, N. V.; KANASHIRO, L.; STEGUN, F. W.; CRODA, J.; DUARTE, M. J.; SOTTO, M. N. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **J. Cutan. Pathol.**, v. 37, p. 565 - 570, 2010.

PASCHER, I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 455, p. 433 – 451, 1976.

PELLICCI, D. G.; CLARKE, A. J.; PATEL, O.; MALLEVAEY, T.; BEDDOE, T.; LE NOURS, J.; ULDRICH, A.P.; McCLUSKEY, J.; BESRA, G.S.; PORCELLI, S.A.; GAPIN, L.; GODFREY, D.I.; ROSSJOHN, J. Recognition of β -linked self-glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. **Nat. Immunol.**, v. 12, p. 827 – 833, 2011.

PERAÇOLI, M. T.; SAORES, A. M.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; PEREIRA, P. C.; REZKALLAH-IWASSO, M. T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p 373 - 380, 1991.

PERAÇOLI, M. T. S.; FORTES, M. R. P.; PEREIRA DA SILVA, M. F.; MONTENEGRO, M. R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 37, p. 129- 136, 1995.

PERAÇOLI, M. T.; KUROKAWA, C. S.; CALVI, S. A.; MENDES, R. P.; PEREIRA, P. C.; MARQUES, S. A.; SOARES, A. M. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 413 - 418, 2003.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunol. Rev.**, v. 213, p. 159 - 179, 2006.

PETRUSCA, D. N.; GU, Y.; ADAMOWICZ, J. J.; RUSH, N. I.; HUBBARD, W. C.; SMITH, P. A.; BERDYSHEV, E. V.; BIRUKOV, K. G.; LEE, C. H.; TUDER, R. M.; TWIGG, H.L.^{3RD}; VANDIVIER, R.W.; PETRACHE, I. Sphingolipid – mediated inhibition of apoptotic cell clearance by alveolar macrophages. **J. Biol. Chem.**, v.285, p. 40322 – 40332, 2010.

PICK, E., MIZEL., D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using as automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods.**, v. 46, p. 211 - 226, 1981.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competente than those of resistant mice control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 1088 – 1099, 2008.

- PINHEIRO, R. O.; PINTO, E. F.; BENEDITO, A. B.; LOPES, U. G.; ROSSI – BERGMANN, B. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 76, p. 519 – 527, 2004.
- POPI, F. A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol.**, v. 218, p. 87 – 94, 2002.
- PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513 – 521, 2009.
- PRINETTI, A.; LOBERTO, N.; CHIGORNO, V.; SONNINO, S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1788, p. 184 – 193, 2009.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. A puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23, p. 323 – 334, 1985.
- RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; GRIESE, J.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; SILVA, R. J.; BARROZO, L.; TAVARES, P. M. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med. Mycol.**, v. 46, p. 35 - 40, 2008.
- RIDLEY, A. J. Rho family proteins: coordinating cell responses. **Trends Cell Biol.**, v. 11, p. 471 – 477, 2001.
- ROEDER, A. C. J.; KIRSCHNING, C. J.; RUPEC, R. A.; SCHALLER, M.; KORTING, H. C. Toll-like receptors and innate antifungal responses. **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 44 – 49, 2004.
- RODRIGUES, M. L.; TRAVASSOS, L. R.; MIRANDA, K. R.; FRANZEN, A. J.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; ALVIANO, C. S.; BARRETO-BERGTER, E. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 7049 - 7060, 2000.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 275 – 288, 2011.
- ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the *in vitro* antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v.18, p. 149 -157, 2002.
- ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its $\beta 2$

receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. **Clin. Immunol.**, v. 114, p. 86 - 94, 2005.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by strogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. immun.**, v. 56, p. 711 - 713, 1988.

SANDHOFF, K.; KLEIN, A. Intracellular trafficking of glycosphingolipids: role of sphingolipid activator proteins in the topology of endocytosis and lysosomal digestion. **FEBS Lett.**, v. 346, p. 103 - 107, 1994.

SAQR, H. E.; PEARL, D. K.; YATES, A. J. A review and predictive models of gangliosídeo uptake by biological membranes. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 395 - 411, 1993.

SCHWARZMANN, G. Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 163 - 171, 2001.

SCOTT, P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. **Science**, v. 260, p. 496 - 497, 1993.

SHEN, W.; LADISCH, S. Ganglioside GD1a impedes lipopolysaccharide-induced maturation of human dendritic cells. **Cell Immunol.**, v. 220, p. 125 - 153, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. R.; MORETTI, M. A. Consenso de paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 297 - 310, 2006.

SHOOSHTARI, P.; FORTUNO, E. S. 3rd; BLIMKIE, D.; YU, M.; GUPTA, A.; KOLLMANN, T. R.; BRINKMAN, R. R. Correlation analysis of intracellular and secreted cytokines via the generalized integrated mean fluorescence intensity. **Cytometry A.**, v. 77, p. 873 - 880, 2010.

SILVA, C. L.; ALVES, L. M.; FIGUEIREDO, F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology**, v. 140, p. 1189 - 1194, 1994.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, p. 131 - 133, 1999.

SILVEIRA, L. H.; PAES, R. C. S.; MEDEIROS, E. V.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis - infection in bovine from microregions of Mato Grosso do Sul - Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo**, v. 47, p. 32, 2005. Apresentado no International Meeting of Paracoccidioidomycosis, 9., 2005, São Paulo.

SIMONS, M.; FRIEDRICHSON, T.; SCHULZ, J. B.; PITTO, M.; MASSERINI, M.; KURZCHALIA, T. V. Exogenous administration of gangliosides displaces GPI-

anchored proteins from lipid microdomains in living cells. **Mol. Biol. Cell.**, v. 10, p. 3187 - 3196, 1999.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 31 – 39, 2000.

SIMONS, K.; GERL, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 11, p. 688 – 699, 2010.

SNYDER-CAPPIONE, J.; NIXON, D. F.; LOO, C. P.; CHAPMAN, J. M.; MEIKLEJOHN, D. A.; MELO, F. F.; COSTA, P. R.; SANDBERG, J. K.; RODRIGUES, D. S.; KALLAS, E. G. Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NK-T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 1361 - 1364, 2007.

SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P. M.; LIVONESI, C. M. L.; FERREIRA, M. B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* – infected mice is modulated by interferon- γ . **Am. J. Pathol.**, v.163, p. 583 – 590, 2003.

SRIRAM, V.; DU, W.; GERVAY – HAGUE, J.; BRUTKIEWICZ, R. R. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 1692 – 1701, 2005.

STANCEVIC, B.; KOLESNICK, R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. **FEBS Lett.**, 584, p. 1728 – 1740, 2010.

SUGIMOTO, Y.; SAKOH, H.; YAMADA, K. IPC synthase as a useful target for antifungal drugs. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 4, p. 311 - 322, 2004.

SUTHERLAND, J. S.; JEFFRIES, D. J.; DONKOR, S.; WALTHER, B.; HILL, P. C.; ADETIFA, I. M. O.; ADEGBOLA, R. A.; OTA, M. O. C. High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. **Tuberculosis**, v. 89, p. 398 – 404, 2009.

TAKAHASHI, H. K.; LEVERY, S. B.; TOLEDO, M. S.; SUZUKI, E.; SALYAN, M. E.; HAKOMORI, S.; STRAUS, A. H. Isolation and possible composition of glucosylceramides from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1441 -1444, 1996.

TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; SUZUKI, E.; TAGLIARI, L.; STRAUS, A. H. Current relevance of fungal and trypanosomatid glycolipids and sphingolipids: studies defining structures conspicuously absent animals. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, p. 477 – 488, 2009.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRAL, S. Toll-Like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 321, p. 335 –376, 2003.

TANG, Z.; SALTZMAN, A. Understanding human dendritic cell biology through gene profiling. **Inflamm. Res.**, v. 53, p. 424 – 441, 2004.

TAVANO, R.; GRI, G.; MOLON, B.; MARINARI, B.; RUDD, C. E.; TUOSTO, L.; VIOLA, A. CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 173, p. 5392 – 5397, 2004.

TAYLOR, P. R.; BROWN, G. D.; REID, M.; WILLMENT, J. A.; MARTINEZ - POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S. Y. C. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol.**, v. 269, p. 3876 – 3882, 2002.

TAYLOR, P. R.; TSONI, S. V.; WILLMENT, J. A.; DENNEHY, K. M.; ROSAS, M.; FINDON, H.; HAYNES, K.; STEELE, C.; BOTTO, M.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. **Nat. Immunol.**, v.8, p. 31 – 38, 2007.

TERÇARIOLI, G. R.; BAGAGLI, E.; REIS, G. M.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MACORIS, S. A. G.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol.**, v. 7, artigo 92, 2007.

TOLEDO, M. S.; SUZUKI, E.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 33, p. 247 - 251, 1995.

TOLEDO, M. S.; SUZUKI, E.; LEVERY, S. B.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Characterization of monoclonal antibody MEST-2 specific to glucosylceramide of fungi and plants. **Glycobiology**, v. 11, p. 105 - 112, 2001.

TOLEDO, M. S.; TAGLIARI, L.; SUZUKI, E.; SILVA, C. M.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibody MEST3 directed to Man α 1 $\rightarrow$ 3man α 1 $\rightarrow$ 2IPC. **BMC Microbiol.**, Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

TOLEDO, R. G.; DA SILVA, W. D.; CALICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol. Immunol.**, v. 48, p. 26 – 36, 2010.

WANKE, B.; AIDÊ, M.A.; Paracoccidioidomycosis. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, p. 1245 – 1249, 2009.

WARNECKE, D.; HEINZ, E. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 919 – 941, 2003.

WILLMENT, J. A.; LIN, H.; REID, D. M.; TAYLOR, P. R.; WILLIAMS, D. L.; WONG, S. Y. C.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 expression and function are

enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 171, p. 171: 4569 – 4573, 2003.

WING, K.; YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. **Trends Immunol.**, v.32, p. 428 – 433, 2011.

WU, D. Y.; SEGAL, N. H.; SIDOBRE, S.; KRONENBERG, M.; CHAPMAN, P. B. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 173 - 181, 2003.

WU, D.; XING, G. W.; POLES, M. A.; HOROWITZ, A.; KINJO, Y.; SULLIVAN, B.; BODMER – NARKEVITCH, V.; PLETTENBURG, O.; KRONENBERG, M.; TSUJI, M.; HO, D. D.; WONG, C. H.; Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 1351 – 1356, 2005.

XU, S.; HUO, J.; GUNAWAN, M.; SU, I. H.; LAM, K. P. Activated dectin-1 localizes to lipid rafts microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 22005 – 22011, 2009.

YAMASHITA, T. Recent advances in the study of glycosphingolipids. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, 2011. In press.

YASUDA, K.; KOSUGI, A.; HAYASHI, F.; SAITOH, S.; NAGAFUKU, M.; MORI, Y.; OGATA, M.; HAMAOKA, T. Serine 6 of Lck tyrosine kinase: a critical site for Lck myristoylation, membrane localization, and function in T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 165, p. 3226 – 3231, 2000.

YWAZAKI, C. Y.; MAZA, P. K.; SUZUKI, E.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUSS, A. H. Role of host glycosphingolipids on *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion. **Mycopathologia**, v. 171, p. 325 - 332, 2011.

YE, Z.; HUANG, H.; HAO, S.; XU, S.; VAN DEN HURK, S.; XIANG, J. IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naïve and active T cell subsets. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 27, p. 1031 – 1038, 2007.

ZHANG, Y.; LI, X.; BECKER, K. A.; GULBINS, E. Ceramide-enriched membrane domains; structure and function. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1788, p. 178 – 183, 2009.

ZHU, Y.; GUMLOW, N.; KARMAN, J.; ZHAO, H.; ZHANG, J.; JIANG, J.; MANIATIS, P.; EDLING, A.; CHUANG, W.; SIEGEL, C.; SHAYMAN, J. A.; KAPLAN, J.; JIANG, C.; CHENG, S. H. Lowering glycosphingolipid levels in CD4+ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 14787 – 14794, 2011.

ANEXOS

ANEXO A: Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PÓS - INFORMAÇÃO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO :

DATA NASCIMENTO:

ENDEREÇO:

Nº: APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE: DDD (   )

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:

SEXO:

DATA NASCIMENTO.:

ENDEREÇO:

Nº :

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE: DDD (   )

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DA PESQUISA: Efeito de glicolípídios de *Paracoccidioides brasiliensis* sobre a resposta imune inata e adaptativa de indivíduos saudáveis curados de paracoccidioidomicose

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gil Benard

CARGO/FUNÇÃO: Vice-responsável – LIM56

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : 48049

– UNIDADE DO HCFMUSP: Dermatologia

3. PESQUISADOR EXECUTANTE: Vanessa Gomes Batista

CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduanda- Doutorado

Farmacêutica Bioquímica. CRF: 16964-Pr

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO (X)

RISCO BAIXO

RISCO MÉDIO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

O objetivo desta pesquisa é estudar o efeito de alguns componentes (glicolipídios, isto é, componentes constituídos de açúcar e lipídios) do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose, sobre as defesas do organismo de pessoas que tiveram paracoccidioidomicose no passado. Com isso espera-se descobrir possíveis mecanismos envolvidos com a susceptibilidade de alguns indivíduos à infecção pelo fungo. Para as análises serão utilizados amostras de sangue dos pacientes e o efeito *in vitro* desses glicolipídios sobre a resposta imunológica será avaliada.

O único desconforto ao qual o paciente será submetido será a coleta de sangue (~50mL) por punção venosa, podendo ocorrer, em casos raros, leve hematoma no local da punção.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O(a) senhor (a) terá

1. Acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Todos os dados e informações obtidos são confidenciais, sigilosos e asseguramos sua completa privacidade.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr Gil Benard, ADEE3002, Tel: ....

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar voluntariamente do presente estudo. Compreendo que a recusa em participar não envolverá nenhuma sanção nem perda de benefícios. Também compreendo que posso retirar meu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem sanção e sem prejuízos de tratamento médico futuro ou alternativo nesta instituição.

São Paulo,   de   de

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador

---

assinatura da testemunha (quem forneceu o termo de consentimento)

ANEXO B: Artigo publicado

BATISTA, V.G. et al. Analysis of invariant Natural Killer T Cells in Human Paracoccidioidomycosis, **Mycopathologia**, v. 172. p. 417-424, 2011

Analysis of Invariant Natural Killer T Cells in Human Paracoccidioidomycosis

Vanessa Gomes Batista · Lúcia Moreira-Teixeira ·
Maria C. Leite-de-Moraes · Gil Benard

Received: 13 February 2011 / Accepted: 12 July 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Invariant natural killer T (iNKT) cells are capable of recognizing lipid antigens and secreting Th1/Th2 cytokines. Deficiency in iNKT cell number or function has been partially implicated in susceptibility to some infectious diseases, such as tuberculosis. We evaluated iNKT cells in paracoccidioidomycosis, another chronic granulomatous disease endemic in Latin America. iNKT cells were detected using PBS57-loaded tetramer staining and flow cytometry. Circulating iNKT cell numbers were similar among healthy individuals who had previously been cured of paracoccidioidomycosis (susceptible individuals,

$n = 7$) and healthy *Paracoccidioides brasiliensis*-infected ($n = 5$) and non-infected individuals ($n = 5$). iNKT from all three groups expanded similarly upon α -GalCer and a synthetic analog (OCH) stimulation. IFN- γ was the dominant cytokine produced both by ex vivo and by expanded iNKT cells, followed by IL-4 and IL-10, in the three groups. No deficit in the monocyte expression of CD1d was detected. In conclusion, individuals who had developed paracoccidioidomycosis in the past have no impairment in iNKT number, expansion capacity, and cytokine secretion.

V. G. Batista · G. Benard
Laboratory of Medical Investigation Unit 53, Tropical
Medicine Institute, University of São Paulo, Avenida
Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470. IMT-II, Têrreo,
São Paulo, SP 05403-907, Brazil

V. G. Batista · G. Benard
Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Medical
School, University of São Paulo, Avenida Dr. Enéas de
Carvalho Aguiar, 470. IMT-II, 3° andar, São Paulo,
SP 05403-907, Brazil

V. G. Batista (✉)
Instituto de Medicina Tropical—IMT-II, Avenida Dr.
Enéas de Carvalho Aguiar, 470. 3° andar, São Paulo,
SP 05403-907, Brazil
e-mail: vagoba@usp.br

L. Moreira-Teixeira · M. C. Leite-de-Moraes
Unité Mixte de Recherche 8147, Centre National de la
Recherche Scientifique, Faculté de Médecine René
Descartes, Paris V, Hôpital Necker, Paris, France

Keywords Paracoccidioidomycosis · iNKT cells ·
Cytokines · iNKT cell expansion · Infectious diseases

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most prevalent systemic mycosis in Latin America and still the leading cause of death among the mycoses [1]. Its causative agent, *Paracoccidioides brasiliensis*, is a thermo-dimorphic fungus that grows as a yeast-like structure in the host tissue and as mycelium in the environment. The infection is acquired by the inhalation of conidia produced by mycelia present in the soil under certain conditions [2]. These conidia reach the lungs where they differentiate into the yeast form establishing the infectious process. However, similar to other endemic mycoses or to tuberculosis,

individuals in endemic areas are infected early in life and most remain long life with latent infection. Studies in Colombia estimate that 9% of the population had contact with the fungus, while the incidence of the disease fluctuated between 0.05 and 0.22/100,000 inhabitants [3]. The reasons why only a minority develops the disease are not known, but may suggest the participation of some aspects of the innate immunity system.

Invariant NKT cells (iNKT cells) are a subset of T cells linked mainly to innate immunity functions of anti-microbial immune responses. These cells do not require priming by prior pathogen exposure, are rapidly triggered upon infection, and may not exhibit the characteristic memory of classical antigen-specific adaptive T-cell response [4]. This subset of T lymphocytes coexpress NK receptors and a restricted TCR, formed by the invariant V α 24-J α 18 chain associated preferentially with the V β 11 chain in humans. They recognize glycolipid antigens presented by the CD1d and once activated, produce large amounts of both Th1 and Th2 cytokines [5, 6] which endow them to play a pivotal role at the interface between innate and adaptive immune responses. They are capable of recognizing a range of bacterial derived lipids [7–9], certain endogenous lipids in animal models [10], but in humans, the putative endogenous lipids or natural ligands are still unknown.

The participation of iNKT cells in diverse infectious diseases is the focus of many studies [11], and conflicting results are frequently reported. For example, studies of an animal model of tuberculosis showed that impairment of iNKT cells function favored disease development [12]. However, others found that genetic depletion of iNKT cells did not result in worsening of the clinical course of the infection with *Mycobacterium tuberculosis* and other intracellular bacteria [13, 14]. In an experimental model of cryptococcosis, it was demonstrated that iNKT cells are recruited to the lungs and that these cells play a pivotal role in inducing Th1 response and host defense. On the other hand, few studies addressed the role of iNKT cells in human infectious diseases. Circulating iNKT cells were decreased or in normal frequencies in HIV- and HCV-infected patients [15–18]. However, not only the quantity of iNKT cells, but also their function, such as the pattern of cytokine production, could be abnormal. In this

regard, higher production of IFN- γ by NK and NKT cells was linked to natural resistance to HIV infection [19]. Also, two studies showed a Th-2-biased cytokine production by iNKT cells during HCV infection [20, 21]. In the studies of human tuberculosis, iNKT cells were shown to be activated [22] and in reduced number in blood [23, 24], which were restored after treatment in one study [24] but not in the other [23]. It is, however, not clear whether alterations in iNKT cells represent a mechanism contributing to the host's susceptibility to the disease or are just secondary to the infectious process itself. The link between deficiency in human iNKT cell function and enhanced susceptibility to an infection still needs to be clarified.

The aim of the present study was to evaluate iNKT cell number and function in paracoccidioidomycosis. Healthy individuals who have had paracoccidioidomycosis were enrolled in this study, representing susceptible individuals that, at the moment of our study, were not under the influence of the alterations associated with an ongoing infection or treatment. We compared this group with healthy individuals who have or have not been exposed to the fungus but never developed PCM.

Materials and Methods

Three groups were enrolled in this study: (1) 7 healthy individuals (29–53 years old), selected from the records of Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, who have had PCM in the past, had been treated for at least 2 years until considered cured, and remained healthy for at least the last 5 years after the completion of treatment (healthy cured [HC] group). They presented no sequelae, had serological data indicating none reactivation of PCM, and had no sign or symptoms of any other debilitating disease at the moment of the study. (2) 5 healthy individuals who never had PCM or any other debilitating disease in the past (20–44 years old) and were non-reactors to the skin test with paracoccidioidin (healthy non-infected [HNI] group). (3) 5 paracoccidioidin-reactive individuals (>10 mm induration after 48 h, age range: 20–42 years), recruited from an endemic area located at the southwest of Brazil (Pratânia, São Paulo state, Brazil) (healthy infected [HI] group). The latter were simultaneously

negative to the skin-test with histoplasmin (<5 mm induration). The study protocol was approved by the ethics committee of the Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. All individuals gave a written informed consent prior to entering the study.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated in a Ficoll-Hypaque gradient and frozen for further analyses. Only cell suspensions with >90% viability after thawing were used. Monocytes were isolated from PBMC using magnetic beads (MACS Cells separation columns, Miltenyi Biotec). CD14⁺ cells purity was >90%. iNKT cells were stained with PBS57-loaded, allophycocyanin-conjugated CD1d tetramers provided by NIH Tetramer facilities. Non-specific binding was controlled by staining with empty CD1d tetramers (data not shown). Other antibodies and reagents used were as follows: CD4-APCCy7, IL-10-FITC, IL-4-APC, IFN- γ -PeCy7 (eBioscience); CD1d-PE, CD14-ECD, (BD - Bioscience); α -galactosylceramide (α -GalCer) and OCH (Axxora Life Sciences Cogem S.A., Paris, France); RPMI 1640, fetal calf serum, and antibiotics (Invitrogen Life Technologies); IL-2, phorbol myristate acetate (PMA), ionomycin, and brefeldin A (Sigma-Aldrich).

For surface, intracellular and tetramer staining, cells were washed in PBS supplemented with 1% BSA (Sigma, St. Louis, MO) and incubated on ice for 30 min with the antibodies or tetramer. Cells were washed and resuspended in 4% paraformaldehyde (PFA) for 5 min at room temperature and then re-washed with PBS-BSA 1%. For intracellular cytokine staining, cells were incubated in PBS containing 0.5% saponin with the appropriate antibodies for 30 min, washed again, and resuspended in PBS-PFA. A FACScalibur or FACSCanto II cytometer (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) was used, and a minimum of 5×10^4 events gated from viable cells were acquired with CellQuest or Diva software. Results were analyzed using Mac CellQuest or FlowJo software.

For iNKT cell expansion experiments, 1×10^6 PBMCs were cultured with α -GalCer (100 ng mL^{-1}) or OCH (500 ng mL^{-1}) in 24-well plates for approximately 12 days. IL-2 (100 UI mL^{-1}) was added in the second day of culture. For intracellular cytokine staining, non-expanded or expanded cells were activated with PMA (50 ng mL^{-1}) and ionomycin (500 ng mL^{-1}), in the presence of brefeldin A

($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 6 h. In some experiments, PBMCs were cultured with α -GalCer and brefeldin A for 6 h to analyze CD1d expression in monocytes and cytokine production by iNKT cells. Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA).

Results

Control individuals (HI and HNI) and individuals cured of PCM (HC) presented similar absolute numbers and percentages of circulating iNKT cells (mainly CD4⁺ [data not shown]), overall ranging from 106 to $5,328 \text{ cells mm}^{-3}$ (from 0.01 to 0.46%) of the total PBMCs (Fig. 1a). There was no statistical difference among the groups. To investigate iNKT cells' capacity to expand, PBMCs were cultured in the presence of α -GalCer and IL-2 for 12 days and the number of CD1d-tetramer⁺ cells was determined. iNKT cells of all three groups expanded to a similar extent, with a mean of 230-fold the initial cell input (Fig. 1c). Again, there was no statistical difference among the groups.

Cytokine-producing capacity was examined in ex vivo iNKT cells as well as after 12 days of α -GalCer/IL-2 culture. Cells then obtained were stimulated with PMA and ionomycin and further intracellularly stained for the different cytokines. The percentage of cytokine-producing cells was determined among gated CD1d-tetramer⁺ lymphocytes. As shown in Fig. 2a, IFN- γ was the main cytokine produced by circulating iNKT cells in all groups; few IL-4⁺ and almost no IL-10⁺ iNKT cells were detected. The cytokine secretion profile of the expanded cells was similar (Fig. 2b), with the difference that the levels of all three cytokines tended to be higher in all groups. Again, there were no significant differences between individuals who had developed the disease (HC) and individuals who remained with latent infection (HI) or were not infected (HNI). The cytokine secretion induced with another agonist of iNKT cells, OCH (data not shown), was also tested to verify whether a different cytokine profile could be observed with a less potent ligand [25]. The cytokine secretion profile was similar to that with α -GalCer and comparable among the three groups. Further experiments were done in a subset of individuals (3 HC, 3 HI, and 3 HNI) in which circulating iNKT cells were directly

Fig. 1 iNKT cells were detected by flow cytometry using PBS57-loaded CD1d tetramer. **a** Ex vivo data—percentage and absolute number of circulating iNKT cells in PBMCs and in peripheral blood, respectively. **b** A representative dot plot of iNKT cell expansion after 12 days of culture and the data of

fold of expansion of one HNI individual, which is representative of all three groups. **c** Fold expansion of HC (healthy cured), HNI (healthy non-infected), and HI (healthy infected) groups after 12 days of culture with α -GalCer + IL-2

Fig. 2 Percentage of IFN- γ (left columns), IL-4 (middle columns), and IL-10 (right columns) producing iNKT cells of circulating (a) and α -GalCer expanded (b) cells of HC (healthy cured), HNI (healthy non-infected) and HI (healthy infected) groups. iNKT cells were gated using PBS57-loaded CD1d tetramer, and intracellular cytokines were detected with specific antibodies

stimulated for 6 h with α -GalCer. Although the percentages of cytokine-expressing cells were lower (mostly <15%), IFN- γ + cells was again the predominant phenotype in the three groups (data not shown).

To rule out a defect of glycolipid presentation to iNKT cells that could interfere with their activation and function, we also examined CD1d expression by monocytes. CD1d was expressed at similar ranges by resting monocytes (40–70%) and by monocytes

incubated for 6 h with α -GalCer (~90%) in all 3 groups.

Discussion

Although artificial iNKT cell activation by α -GalCer, its most potent known agonist, abbreviated the clinical course of different experimental models of infectious diseases [26–30], the physiological role of iNKT cells in these models as well as in human host still remains unclear. Studies of patients with chronic granulomatous diseases are rare. In tuberculosis, it was shown that reduced number of circulating iNKT cells might be one mechanism for susceptibility to *M. tuberculosis* [23, 24]. Also, iNKT cells have been implicated in granuloma formation in tuberculosis in mice [31]. In leprosy, it has been shown that iNKT cells were present in the biopsy of lesions of patients within the tuberculoid pole while absent from biopsies of patients at the anergic, lepromatous pole [32]. It was then speculated that iNKT cell dysfunction might alter granuloma formation in humans and, consequently, the control of mycobacterial or other microbial dissemination in chronic granulomatous diseases. Of note, no studies addressed iNKT cells in human systemic mycoses. Thus, we evaluated some aspects of iNKT cell function to verify whether disturbance in iNKT cells could participate in susceptibility to PCM.

In this work, we evaluated iNKT cell number, expansion capacity, and cytokine secretion in individuals cured of PCM. Since most of the individuals living in endemic areas control the initial infection and will never develop the disease, the concept emerges that the few who develop the disease may present some defect in innate immunity mechanisms, being iNKT cells a good candidate. We provide evidence here that these individuals present similar number of circulating iNKT cells. The later can equally expand in vitro in response to α -GalCer or OCH whatever they were derived from HI, HNI, or HC group. The reduction of iNKT cells during infection observed in some studies could be due to the redistribution from blood circulation to the sites of granulomatous inflammation, as already shown in sarcoidosis [33].

In addition, iNKT cells from cured individuals could produce the same profile of cytokines than did

healthy infected and non-infected individuals. In every individual tested, there was a clear predominance of IFN- γ -expressing cells over IL-4 and IL-10-expressing cells upon challenge with PMA/ionomycin in ex vivo cells or cells pre-activated with α -GalCer or OCH. This was also observed when iNKT cells were directly stimulated for 6 h with α -GalCer, without PMA/ionomycin activation, although the percentages of cytokine-expressing cells were lower. These data are in agreement with our observations of normal CD1d expression by monocytes, either before or after challenge with α -GalCer. Thus, we suggest that the CD1d-NKT cell pathway was preserved in our healthy cured individuals.

In conclusion, we demonstrate that individuals who had developed PCM in the past have no impairment in iNKT cell number, expansion, and cytokine secretion. However, other aspects of iNKT cell function remain to be studied, such as the role of iNKT cells activated by cytokines (e.g., IL-12) rather than by TCR engagement, since there are marked differences in cytokine balance between paracoccidioidomycosis-susceptible and paracoccidioidomycosis-resistant animal models [34].

Acknowledgments We thank National Institute of Health (NIH) for the kind donation of the PBS57-loaded tetramer, Dr Cristina Crespo Rodrigues for the help in the recruitment of the donors and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

References

1. Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:513–21.
2. Barrozo LV, Benard G, Silva ME, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;30:4(3):e643.
3. Torrado E, Castañeda E, Hoz F, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: definición de las áreas endémicas de Colombia [in Spanish]. *Biomedica*. 2000;20:327–34.
4. Brigl M, Brenner MB. CD1d: antigen presentation and T cell function. *Ann Rev Immunol*. 2004;22:817–90.
5. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol*. 2005;26:877–900.
6. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297–336.
7. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong CH, Kronenberg M.

- Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005;434:520–55.
8. Sriram V, Du W, Gervay-Hague J, Brutkiewicz RR. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:1692–701.
  9. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, Hurwitz R, Kursar M, Bonneville M, Kaufmann SH, Schaible UE. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:10685–90.
  10. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C III, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*. 2005;434:525–9.
  11. Behar SM, Porcelli SA. CD1-d-Restricted T cells in host defense to infectious diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;314:213–48.
  12. Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. *Infect Immun*. 2002;70:6302–9.
  13. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 1999;189:1973–80.
  14. Szalay G, Ladel CH, Blum C, Brossay L, Kronenberg M, Kaufmann SHE. Anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF-2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice. *J Immunol*. 1999;162:6955–8.
  15. van der Vliet HJ, Molling JW, von Blomberg BM, Kölgén W, Stam AG, Gruijl TD, Mulder CJ, Janssen HL, Nishi N, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, van Nieuwerkerk CJ. Circulating Valpha24 + Vbeta11 + NKT cell numbers and dendritic cell CD1d expression in hepatitis C virus infected patients. *Clin Immunol*. 2005;114:183–9.
  16. van der Vliet HJ, van Vonderen MG, Molling JW, Bontkes HJ, Reijm M, Reiss P, van Agtmael MA, Danner SA, van den Eertwegh AJ, von Blomberg BM, Scheper RJ. Cutting edge: rapid recovery of NKT cells upon institution of highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *J Immunol*. 2006;177:5775–8.
  17. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, Prins M, Claessen FA, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Miedema F, Scheper RJ, Pinedo HM. Selective decrease in circulating V alpha 24 + V beta 11 + NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168:1490–5.
  18. Lucas M, Gadola S, Meier U, Young NT, Harcourt G, Karadimitris A, Coumi N, Brown D, Dusheiko G, Cerundolo V, Klenerman P. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2003;77:251–7.
  19. Montoya CJ, Velilla PA, Chougnet C, Landay AL, Rugeles MT. Increased IFN-gamma production by NK and CD3 +/CD56 + cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clin Immunol*. 2006;120:138–46.
  20. Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, Nuti S, Colombo M, Callea F, Porcelli SA, Panina-Bordignon P, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol*. 2004;173:1417–25.
  21. Durante-Mangoni E, Wang R, Shaulov A, He Q, Nasser I, Afdhal N, Koziel MJ, Exley MA. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J Immunol*. 2004;173:2159–66.
  22. Montoya CJ, Cataño JC, Ramirez Z, Rugeles MT, Wilson SB, Landay AL. Invariant NKT cells from HIV-1 or *Mycobacterium tuberculosis*-infected patients express an activated phenotype. *Clin Immunol*. 2008;127:1–6.
  23. Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Loo CP, Chapman JM, Meiklejohn DA, Melo FF, Costa PR, Sandberg JK, Rodrigues DS, Kallas EG. Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NKT cells. *J Infect Dis*. 2007;195:1361–4.
  24. Sutherland JS, Jeffries DJ, Donkor S, Walther B, Hill PC, Adetifa IMO, Adegbola RA, Ota MOC. High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. *Tuberculosis*. 2009;89:398–404.
  25. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 2001;413:531–4.
  26. Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Koguchi Y, Uezu K, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A. Activation of Valpha14 + natural killer T cells by alpha-galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2001;69:213–20.
  27. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Nakasone C, Uezu K, Kinjo T, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A. Critical role of Vα14 natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol*. 2003;33:3322–30.
  28. van Dommelen SL, Tabarias HA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J Virol*. 2003;77:1877–84.
  29. Duthie MS, Kahn SJ. Treatment with alpha-galactosylceramide before *Trypanosoma cruzi* infection provides protection or induced failure to thrive. *J Immunol*. 2002;168:5778–85.
  30. Gonzalez-Aseguinolaza G, Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Romero OB, Nakayama T, Taniguchi M, Bendelac A, van Kaer L, Koezuka Y, Tsuji M. Alpha-Galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8461–6.
  31. Apostolou I, Takahama Y, Belmont C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Cui J, Taniguchi M, Nakauchi H, Fournié JJ, Kourilsky P, Gachelin G. Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:5141–6.

32. Mempel M, Flageul B, Suarez F, Ronet C, Dubertret L, Kourilsky P, Gachelin G, Musette P. Comparison of the T cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. *Am J Pathol.* 2000;157:509–23.
33. Kobayashi S, Kaneko Y, Seino K, Yamada Y, Motohashi S, Koike J, Sugaya K, Kuriyama T, Asano S, Tsuda T, Wakao H, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Taniguchi M. Impaired IFN-gamma production of Valpha24 NKT cells in non-remitting sarcoidosis. *Int Immunol.* 2004;16:215–22.
34. Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, Ribeiro LR, de Cássia Valente-Ferreira R, Pina A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia.* 2008;165:223–36.