PAULA KEIKO SATO

Avaliação dos efeitos de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose: expressão de moléculas de superfície, linfoproliferação e secreção de citocinas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

**São Paulo
2015**

PAULA KEIKO SATO

Avaliação dos efeitos de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose: expressão de moléculas de superfície, linfoproliferação e secreção de citocinas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sato, Paula Keiko

Avaliação dos efeitos de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose : expressão de moléculas de superfície, linfoproliferação e secreção de citocinas / Paula Keiko Sato. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Aparecida Shikanai Yasuda.

Descritores: 1.Paracoccidioidomicose 2.Células dendríticas 3.Antígenos fúngicos 4.Citocinas 5.Proliferação de células 6.Imunidade celular

USP/FM/DBD-388/15

Aos pacientes

Aos meus pais Paulo e Wilma

Agradeço

À minha orientadora **Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda**, pelo apoio, paciência e incentivo por todo o caminho.

A todos que já passaram ou estão no **Laboratório de Investigação Médica em Imunologia (LIM 48)**, Alexei, Aya, Carol Mamana, Carol Medeji, Célia, Claudia Fonseca, Claudia Oliveira, Claudia Ubida, Constância, Daiane, Daniel Go, Daniel Valério, Débora, Diego, Érika Passos, Érika Shimoda, Eron, Felipe, Fernanda, Flávia, Karina, Marcello, Márcia Andrea, Márcia Yoshida, Maria Izani, Marjorie, Dra. Marta, Natália, Nídia, Rafael, Sheila, Tati Molina, Tati Giselle, Telma, Vera e Vivian, pela amizade e apoio na realização desse trabalho.

Aos meus pais, **Paulo** e **Wilma**, por todo amor, carinho e incentivo incondicionais.

À minha irmã e amiga, **Thaís**, por estar sempre disposta a me ouvir, me aconselhando e me acalmando nas horas difíceis.

Ao meu irmão, **Daniel**, minha cunhada, **Luciana**, e minha sobrinha/afiliada, **Júlia**, pelo apoio e pela formação de sua família que me trouxe muita alegria.

Às amigas, **Constância** L. D. Lorente e **Érika** C. Passos, pelo companheirismo e por todo auxílio nos experimentos.

Aos amigos, **Flávia** M. C. Carvalho e **Felipe** D. Busser, pelo apoio e compreensão, especialmente nos últimos meses que antecederam a entrega da tese.

À **Dra. Adriana Kono** e à **Dra. Márcia Yoshida**, por toda ajuda na seleção dos pacientes.

Às **funcionárias do Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sempre prontas para ajudar, sempre dedicadas aos pacientes.

À minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Sandro R. de Almeida**, **Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda** e **Dra. Carla Pagliari**, por dedicarem tempo e atenção ao meu trabalho e pelas sugestões tão preciosas que me ajudaram a elaborar o trabalho final.

À secretária da pós-graduação do programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, **Roseli** Antônia Santo, por toda a ajuda durante o curso, nas horas de alegria e sufoco.

À secretária da Comissão de Ética em Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, **Luiza** Maria Vieira de Assis, por me ajudar com a documentação do projeto.

Aos amigos de sempre, **Agata** (Gagá), **Eduardo** Takao (Dú), **Juliana** (Jubs), **Marina Sanches** (Pi), **Marina Takao** (Má), **Najara** (Ná) e **Uíol** (Tio U), pela amizade e pelas horas de muito riso que me ajudaram a passar por todo o processo com um pouco de leveza.

Às colegas do Laboratório de Micologia (LIM53), **Natalina** Takahashi de Melo, **Elisabeth** Maria Heins e **Roseli** de Freitas, que me receberam como estagiária,

me ensinaram muito em tão pouco tempo e continuaram me ajudando mesmo depois que eu mudei para o “vizinho”.

Ao **Dr. Luiz Jorge Fagundes**, por me dar a mão num momento difícil, antes mesmo de me conhecer, e me indicou o caminho para a Micologia.

Ao amigo, **Filipe** Pires (Fi), que nem deve saber, mas me ajudou muito nos últimos dias antes da entrega desse trabalho com suas palavras de incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho.
Meu sincero “OBRIGADA”!

“We don't know a millionth of one percent about anything.”

Thomas Alva Edison

Este estudo foi realizado com apoio financeiro da Fundação de apoio à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2004/14955-3), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 566478/2008-0) e da Fundação Faculdade de Medicina.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS	18
3.1 Casuística	19
3.2 Critérios de inclusão	19
3.3 Obtenção da gp43 (glicoproteína de 43 kDa de <i>P. brasiliensis</i>)	20
3.4 Preparo de CFA (“Cell-Free Antigen” de <i>P. brasiliensis</i>)	21
3.5 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos	21
3.6 Estímulo das células dendríticas derivadas de monócitos	22
3.7 Caracterização de células dendríticas derivadas de monócitos	23
3.8 Proliferação de linfócitos autólogos em co-cultivo com células dendríticas derivadas de monócitos	24
3.9 Proliferação de células mononucleares de sangue periférico frente aos antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	25
3.10 Detecção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de cultura de células	26
3.10.1 Detecção das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ e TNF- α em sobrenadantes de cultura de células	26
3.10.2 Detecção da quimiocina CCL18 em sobrenadantes de cultura de células	28
3.11 Análises dos resultados	30
3.12 Esquema geral do experimento	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Padronização dos ensaios de diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos	33

4.2	Padronização das concentrações dos antígenos de <i>P. brasiliensis</i> para estímulo de células dendríticas derivadas de monócitos	37
4.2.1	Determinação da concentração de gp43	37
4.2.2	Determinação da concentração de CFA	39
4.2.3	Proliferação de células mononucleares de sangue periférico frente aos antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	41
4.3	Comparação entre grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com PCM da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos frente aos antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	44
4.3.1	Expressão da molécula CD11c	45
4.3.2	Expressão da molécula CD1a	47
4.3.3	Expressão da molécula HLA-DR	49
4.3.4	Expressão da molécula CD86	51
4.3.5	Expressão da molécula CD80	53
4.3.6	Expressão da molécula DC-SIGN	55
4.4	Efeito de antígenos de <i>P. brasiliensis</i> na secreção de citocinas por células dendríticas derivadas de monócitos	57
4.4.1	Níveis da citocina IL-10	57
4.4.2	Níveis da citocina IL-12p40	59
4.4.3	Níveis da citocina IL-1 β	61
4.4.4	Níveis da quimiocina CCL18	62
4.5	Co-cultivo de células dendríticas derivadas de monócitos e linfócitos autólogos	65
4.6	Secreção de citocinas em co-cultivo de células dendríticas derivadas de monócitos e linfócitos autólogos	70
4.6.1	Níveis da citocina IL-10	70
4.6.2	Níveis da citocina IL-4	72
4.6.3	Níveis da citocina IFN- γ	74
4.6.4	Níveis da citocina TNF- α	76
5.	DISCUSSÃO	80
6.	CONCLUSÕES	95
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	ANEXO	108

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos ("Antigen Presenting Cells")
CCL18	Quimiocina (C-C) Ligante 18 ("Chemokine C-C motif Ligant 18")
CD	Grupo de Diferenciação ("Cluster of Differentiation")
CFA	Antígeno solúvel Livre de Células ("Cell-Free Antigen")
CO	Indivíduos sadios (grupo controle)
DCs	Células Dendríticas derivadas de monócitos ("Dendritic Cells")
DC+TNF	Células Dendríticas tratadas com TNF- α
DC-SIGN	Não-integrina ligante de ICAM Específica de Células Dendríticas ("Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin")
ELISA	Ensaio imuno-enzimático ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay")
et al.	e outros
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ("Fluorescein Isothiocyanate")
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônia de Granulócito e Macrófagos ("Granulocyte and Macrophages Colony Stimulating Factor")
gp43	glicoproteína de 43kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano ("Human Leukocyte Antigen")
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
Li	Linfócitos autólogos
ND	Níveis não-detectados
nDC	Células dendríticas não-tratadas
PA	Pacientes com paracoccidioidomicose ativa
PBS	Tampão salina fosfato

PCM	Paracoccidioidomicose
PE	Ficoeritrina ("Phosphate Buffer Saline")
PT	Pacientes com paracoccidioidomicose tratada
SEM	Erro Padrão da Média ("Standard Error of Mean")
TGF-β	Fator de Transformação de Crescimento-beta ("Transforming Growth Factor-beta")
Th1	T "helper" 1
Th2	T "helper" 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa ("Tumor Necrosis Factor-alpha")

LISTA DE SÍMBOLOS

$\approx$	aproximadamente
g	força G
$>$	maior
$\geq$	maior ou igual
$\pm$	mais ou menos
$<$	menor
$\leq$	menor ou igual
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
μL	microlitro
M	Molar
ng/mL	nanogramas por mililitro
nM	Nanomolar
nm	nanômetros
N	Normal
pg/mL	picogramas por mililitro
kDa	quilo-Dalton

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Perfil em citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico de indivíduo sadio	35
Figura 2.	Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos	36
Figura 3.	Efeito de diferentes concentrações de gp43 na expressão das moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos de paciente com PCM tratada	38
Figura 4.	Efeito de diferentes concentrações de CFA na expressão das moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos de paciente com PCM tratada	40
Figura 5.	Proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	43
Figura 6.	Expressão da molécula CD11c	46
Figura 7.	Expressão da molécula CD1a	48
Figura 8.	Expressão da molécula HLA-DR	50
Figura 9.	Expressão da molécula CD86	52
Figura 10.	Expressão da molécula CD80	54
Figura 11.	Expressão da molécula DC-SIGN	56
Figura 12.	Níveis da citocina IL-10 em sobrenadantes de cultura de células dendríticas	58
Figura 13.	Níveis da citocina IL-12p40 em sobrenadantes de cultura de células dendríticas	60
Figura 14.	Níveis da citocina IL-1 β em sobrenadantes de cultura de células dendríticas	61
Figura 15.	Níveis da quimiocina CCL18 em sobrenadantes de cultura de células dendríticas	62
Figura 16.	Determinação da proporção células dendríticas/linfócitos autólogos em co-cultivo	66
Figura 17.	Proliferação de linfócitos autólogos frente às células dendríticas	69
Figura 18.	Níveis da citocina IL-10 em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas	71
Figura 19.	Níveis da citocina IL-4 em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas	73
Figura 20.	Níveis da citocina IFN- γ em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas	75
Figura 21.	Níveis da citocina TNF- α em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos 58 pacientes com paracoccidiodomicose ativa (PA) e tratada (PT), e dos 39 indivíduos sadios (CO), segundo sexo, idade, grupo e formas clínicas, aguda (AG) ou crônica (CR)	20
Tabela 2.	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre as médias de proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) frente aos estímulos de PHA a 5 µg/mL (PBMC+PHA), gp43 a 1 µg/mL (PBMC+Gp1) e de CFA a 2 µg/mL (PBMC+CFA2) ou 5 µg/mL (PBMC+CFA5) em comparação às culturas de PBMCs não-estimuladas (PBMC+Meio), dos grupos de indivíduos sadios (CO), pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT)	63
Tabela 3.	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças nas médias de proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) entre os grupos de indivíduos sadios (CO), pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT), frente a gp43 a 1 µg/mL (Gp1) e CFA a 2 µg/mL (CFA2) ou 5 µg/mL (CFA5)	63
Tabela 4.	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre as culturas de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF-α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 5 µg/mL (Gp5), e CFA a 15 µg/mL (CFA), de pacientes com PCM tratada (PT)	64
Tabela 5.	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os grupos de indivíduos sadios (CO), pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT), segundo a cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF-α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 µg/mL (Gp2) e 5 µg/mL (Gp5), e CFA a 15 µg/mL (CFA)	64
Tabela 6.	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os níveis de proliferação e de citocinas em culturas de linfócitos ou co-cultivos de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF-α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 µg/mL (Gp2) e a 5 µg/mL (Gp5), e CFA a 15 µg/mL (CFA), por grupos de pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT), co-cultivadas com linfócitos autólogos (Li)	78
Tabela 7.	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os grupos de indivíduos sadios (CO), de pacientes com PCM ativa (PA) e de pacientes com PCM tratada (PT), no co-cultivo de células dendríticas previamente tratadas com TNF-α e estimuladas com CFA a 15 µg/mL e linfócitos autólogos (Li+DC+TNF+CFA)	79

Sato PK. *Avaliação dos efeitos de antígenos de Paracoccidioides brasiliensis em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose: expressão de moléculas de superfície, linfoproliferação e secreção de citocinas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A paracoccidioidomicose (PCM) induz uma resposta imune tipo Th1 relacionada à proteção, com imunodepressão antígeno-específica transitória. As células dendríticas (DCs) são as mais potentes apresentadoras de antígeno, porém, pouco se sabe sobre seu papel na PCM humana e sobre os efeitos do fungo em suas funções. **OBJETIVO:** Investigar os efeitos *in vitro* de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) sobre as DCs derivadas de monócitos de pacientes com PCM. **MÉTODOS:** Foram incluídos 27 pacientes com PCM ativa (PA; com diagnóstico micológico, histopatológico ou títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* ≥ 32) e 31 pacientes com PCM tratada (PT; anticorpos anti-*P. brasiliensis* com títulos ≤ 4 , em duas coletas num período de 6 meses, e doença comprovada no passado pelos mesmos critérios de pacientes com PCM ativa), e de 39 indivíduos saudáveis (CO; não sensibilizados a antígenos de *P. brasiliensis* e sem anticorpos a tais antígenos fúngicos) foram geradas a partir de monócitos do sangue periférico, tratados com IL-4 e GM-CSF. As DC diferenciadas não-tratadas (nDC) ou tratadas com TNF- α (DC+TNF) foram estimuladas com os antígenos de *P. brasiliensis*: glicoproteína de 43 kDa (gp43) a 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2 e Gp5), e antígeno solúvel a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA). As moléculas de superfície CD11c, CD1a, HLA-DR, CD86, CD80 e DC-SIGN das DCs foram analisadas por citometria de fluxo e as citocinas IL-10, IL-12p40, IL-1 β e CCL18 foram dosadas nos sobrenadantes das culturas por ELISA. As DCs foram então co-cultivadas com linfócitos autólogos, medindo-se a linfoproliferação por incorporação de timidina triciada e dosando-se por ELISA os níveis de citocinas IL-10, IL-4, IFN- γ e TNF- α foram dosadas nos sobrenadantes dessas culturas. **RESULTADOS:** As DCs de PA e PT apresentaram expressão de CD11c e CD1a similar à observada nas DCs de CO. No grupo PT, Gp5 induziu maior expressão de HLA-DR em comparação ao grupo PA, e o CFA aumentou o percentual de DCs CD86+. As DCs de PT, na presença de TNF- α , secretaram grandes quantidades de IL-12p40, especialmente frente ao CFA. Este antígeno induziu forte proliferação de linfócitos autólogos tanto de pacientes do grupo PA quanto do grupo PT, em relação ao grupo CO e às células sem CFA. Os níveis de IL-10 foram maiores no grupo PA, enquanto que os de IL-4 foram maiores no grupo PT, tanto nos co-cultivos com DCs e Gp quanto com DCs e CFA. Por outro lado, apenas o estímulo de DCs com CFA, e não com gp43, induziu altos níveis de IFN- γ e TNF- α . **CONCLUSÕES:** DCs de PT tem alta expressão de HLA-DR, CD86 e DC-SIGN, altos níveis de IL-12p40 e baixos de IL-10, induzidos por CFA. DCs de PA apresentam expressão de moléculas similar às de DCs de indivíduos saudáveis, e baixos níveis de IL-12p40 e IL-10. A gp43 induziu pouca linfoproliferação e baixos níveis de IFN- γ e TNF- α nos co-cultivos de linfócitos autólogos e DCs de PT e PA. O CFA foi mais eficiente que a gp43 no estímulo de DCs PT e PA mas não de CO, ao induzir proliferação de linfócitos autólogos com aumento da secreção de IFN- γ e TNF- α . Esses resultados, combinados aos níveis constantes de IL-10 e altas concentrações de IL-12p40, sugerem que o CFA seja melhor indutor de resposta Th1, podendo servir como alvo para pesquisas de epítomos candidatos à vacina de células dendríticas anti-*P. brasiliensis*.

Descritores: paracoccidioidomicose; células dendríticas; antígenos fúngicos; citocinas; proliferação de células; imunidade celular.

Sato PK. *Evaluation of Paracoccidioides brasiliensis antigens effects on monocyte-derived dendritic cells from patients with paracoccidioidomycosis: expression of surface molecules, lymphoproliferation and secretion of cytokines* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

INTRODUCTION: Paracoccidioidomycosis (PCM) induces a Th1 immune response associated with protection, with a transitory antigen-specific immunodepression. Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cells, but little is known about their role on human PCM and the effects of fungal antigens on their functions. **OBJECTIVE:** To investigate the *in vitro* effects of *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) antigens on monocyte-derived DCs from patients with PCM. **METHODS:** Twenty-seven patients with active PCM (PA; with mycological or histopathological diagnosis or antibody titres anti-*P. brasiliensis* ≥ 32) and 31 treated PCM (PT; antibody titres ≤ 4 on two samples within six months, and proved disease in the past by the same criteria of active PCM) and from 39 non-PCM subjects (CO; non-sensitized to *P. brasiliensis* antigens and without anti-fungal antigens antibodies) were included in this study and DCs were generated from peripheral blood monocytes with IL-4 and GM-CSF. Differentiated DCs were treated with TNF- α (DC+TNF) or left untreated (nDC) and then stimulated with *P. brasiliensis* antigens: 43 kDa glycoprotein (gp43) at 2 and 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2 and Gp5), and the cell-free antigen at 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA). Surface molecules CD11c, CD1a, HLA-DR, CD85, CD80 and DC-SIGN were analyzed by flow cytometry and the cytokines IL-10, IL-12p40, IL-1 β and CCL18 were assayed by ELISA. DCs were cocultured with autologous lymphocytes: lymphoproliferation was measured by the incorporation of tritiated thymidine and the cytokines IL-10, IL-4, IFN- γ and TNF- α were also assayed by ELISA. **RESULTS:** DCs from PA and PT groups showed similar expression of CD11c and CD1a to those of CO group. On the PT group, Gp5 induced higher expression of HLA-DR when compared to PA and CFA increased the percentage of CD86+ DCs. When stimulated with CFA, TNF- α -treated DCs from the PT group secreted large amounts of IL-12p40. This antigen also induced strong proliferation of autologous lymphocytes on both PA and PT groups in comparison to CO group and to unstimulated cells. Both DCs with CFA and DCs with gp43 induced high levels of IL-10 and IL-4 on the PA and PT groups, respectively. On the other hand, only DCs with CFA and not those with gp43 were able to induce high levels of IFN- γ and TNF- α . **CONCLUSIONS:** CFA-stimulated DCs from treated PCM showed high expression of HLA-DR, CD86 and DC-SIGN, increased levels of IL-12p40 and low levels of IL-10. DCs from patients with active disease have expression of surface molecules similar to those of non-PCM subjects, with low levels of IL-12p40 and IL-10. Gp43 induced low lymphoproliferation and decreased levels of IFN- γ and TNF- α in the cocultures of DC and autologous lymphocytes from PT and PA groups. CFA was more efficient than gp43 on stimulating DCs to induce proliferation of autologous lymphocytes with increased secretion of IFN- γ and TNF- α on both PT and PA cells but not on CO. These results combined with constant levels of IL-10 and high amounts of IL-12p40 suggest that CFA may be a better inducer of Th1 immune response and a suitable target for future researches on epitopes candidates for anti-*P. brasiliensis* dendritic cell-based vaccines.

Descriptors: paracoccidioidomycosis; dendritic cells; fungal antigens; cytokines; cell proliferation; cellular immunity.

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica granulomatosa, de evolução aguda ou crônica, causada pelas espécies fúngicas dimórficas *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e *Paracoccidioides lutzii*. É uma das mais importantes micoses endêmicas na América Latina, prevalente do México à Argentina, sendo considerada uma doença profissional, adquirida em áreas rurais por indivíduos previamente imunocompetentes, e especialmente grave em centros urbanos em pacientes sob imunossupressão relacionada à infecção por HIV ou à quimioterapia por neoplasia ou transplante de órgão (Franco et al., 1994; Marques & Shikanai-Yasuda, 1994; Teixeira et al., 2009; Bocca et al., 2013).

Entre Janeiro de 1998 e Dezembro de 2006, foram registradas 6 372 admissões hospitalares devido a PCM no Brasil, sendo uma das principais causas de morte entre as micoses sistêmicas (Prado et al., 2009; Coutinho et al., 2015).

O contágio ocorre por inalação de conídios, partículas infectantes de 3 a 5 µm de diâmetro (Bustamante-Simon et al., 1985), que no tecido pulmonar se transformam em leveduras e induzem uma resposta inflamatória inicialmente mediada por células polimorfonucleares, seguida por infiltrado linfomononuclear que pode se apresentar como um complexo primário no modelo experimental (McEwen et al., 1987).

Na maioria das vezes, o contato do fungo com a criança ou adulto jovem resulta em equilíbrio da interação parasito-hospedeiro, constituindo a paracoccidioidomicose infecção, permanecendo o fungo latente nos tecidos. Se nesta interação não ocorrer o equilíbrio observado na infecção, a doença pode ocorrer na forma aguda, com disseminação linfohematogênica acometendo o sistema fagocítico mononuclear. A

doença também ocorre na forma crônica, após muitos anos, na idade adulta, principalmente após a terceira década, quando se rompe o equilíbrio da interação hospedeiro-parasito. Há reativação de lesões quiescentes, sendo mais frequentemente acometido o pulmão, podendo estar comprometidos outros órgãos e tecidos.

A evolução da infecção para doença depende de vários fatores como a interação entre o ambiente, resposta imune do hospedeiro e patogenicidade do parasito. Embora várias expressões dessa evolução tenham já sido descritos (Oliveira et al., 2002; Cavassani et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Castro et al., 2013), os mecanismos que controlam a evolução da interação hospedeiro-parasito são pouco conhecidos (Vicentini et al., 1994; Sadahiro et al., 2007a; Panagio et al., 2008; Barrozo et al., 2010).

O antígeno majoritário de *P. brasiliensis* é secretado pela fase infectante do fungo, sendo caracterizado como uma glicoproteína de 43 kDa (gp43), rica em manose, e que se liga à Concanavalina A (Travassos, 1994). Além disso, é também capaz de se ligar à laminina da matriz extracelular, facilitando a ação patogênica do fungo *in vivo* (Lopes et al., 1994; Vicentini et al., 1994). O sequenciamento e clonagem do gene que codifica a gp43 revelaram que o quadro de leitura deste gene está localizado num fragmento de 1.329 pares de bases, contendo dois éxons interrompidos por um íntron de 78 nucleotídeos (Cisalpino et al., 1996). Mais recentemente, Torres et al. (2013) criaram um mutante de *Paracoccidioides brasiliensis* que expressa até 85 % menos essa molécula e verificaram uma correlação entre a baixa expressão de gp43 e a baixa patogenicidade em camundongos.

Tendo como alvo identificar epítomos da gp43 indutores de uma resposta de hipersensibilidade tardia, considerada protetora, Taborda et al. (1998) demonstraram que entre as frações de peptídeos derivados da gp43, um peptídeo de 15 aminoácidos (P10) foi capaz de promover a ativação de células T murinas e induzir altos níveis de

Interferon (IFN)- γ em ensaios *in vitro*, promovendo uma resposta protetora em camundongos desafiados intratraquealmente com cepas virulentas de *P. brasiliensis*. Inversamente, os peptídeos denominados P4 e P23 estão relacionados à inibição da resposta inflamatória e das funções de macrófagos de camundongos infectados com o fungo (Konno et al., 2009 e 2012). A investigação dessas frações antigênicas na doença experimental abre novas perspectivas para aplicação destes peptídeos na terapêutica.

A gp43 é detectada sistemicamente nas formas ativas da doença, sendo útil para fins diagnósticos e de controle pós- terapêutico, como observado pela pesquisa deste antígeno em sangue (Mendes-Giannini et al., 1990; Marques da Silva et al., 2004), na urina (Salina et al., 1998) e no líquido (Marques da Silva et al., 2004). Também foi verificado que a gp43 é capaz de promover reações de hipersensibilidade tardia, tanto em animais quanto em humanos (Godoy et al., 2003; Saraiva et al., 1996; Kalmar et al., 2004).

Esta glicoproteína revelou ser um antígeno majoritário, capaz de induzir a produção de anticorpos, além de ser reconhecido pela maioria dos pacientes infectados (Puccia & Travassos, 1991). O estudo de subclasses de imunoglobulina(Ig)G mostrou que em 41 % dos pacientes com a forma crônica da doença observa-se presença de IgG2, enquanto IgG4 está presente em 100 % dos pacientes de forma aguda (Baida et al., 1999). Por sua vez, Juvenale et al. (2001) utilizando antígeno bruto de *P. brasiliensis*, descreveram IgG2 detectável em ambas as formas clínicas, com níveis mais elevados na forma crônica e IgG4 principalmente na forma aguda da doença. Ambos os autores relataram que a IgA foi mais frequente nos pacientes com a forma crônica, do que na forma aguda da doença.

A aplicabilidade da gp43 no diagnóstico e principalmente no controle pós- terapêutico tem sido inviável na prática clínica, devido à limitação na obtenção do

antígeno em larga escala, em função de dificuldades técnicas. Nesse sentido, Camargo et al. (1991) desenvolveram um extrato antigênico, o “Cell-Free Antigen” (CFA), de preparo fácil e rápido, para o uso em testes imunodiagnósticos. Retirado diretamente de culturas leveduriformes de *P. brasiliensis* cepa B-339, esse extrato revelou em eletroforese em gel de poliacrilamida, padrões polipeptídicos entre 10 e 110 kDa, sendo a de 43 kDa, a principal banda de precipitação. Posteriormente, o CFA foi testado com soros de pacientes com as formas aguda e crônica da PCM em reações de “Immunoblot”, sendo a banda de 43 kDa reconhecida por 100 % das amostras (Blotta & Camargo, 1993).

Com relação à susceptibilidade e resistência na PCM, Calich & Kashino (1998) mostraram que em modelo de camundongos isogênicos A/Sn (resistentes) e B10.A (suscetíveis) infectados com leveduras de *P. brasiliensis*, a produção de IFN- γ e Interleucina(IL)-2 está relacionada ao papel protetor, sustentando fortemente a hipótese de resposta preferencial tipo T “helper”(Th)1, associada ao fenótipo de resistência. Por outro lado, a suscetibilidade está ligada à resposta do tipo 2 (Th2) com produção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF(Fator de Transformação de Crescimento)- β .

A relação entre imunidade por células e formas clínicas da doença foi descrita por Musatti et al. (1976) e Mota et al. (1985), demonstrando-se maior grau de imunodepressão celular nas formas disseminadas e menor grau nas localizadas. Posteriormente, Benard et al. (1996) observaram imunodepressão transitória ao antígeno de *P. brasiliensis* com recuperação nas formas clínicas agudas e crônicas após a cura clínica.

Karhawi et al. (2000) relataram que em pacientes com a forma crônica ativa da doença, a produção de IFN- γ foi baixa na presença de antígeno bruto de *P. brasiliensis*

em relação aos pacientes com remissão clínica. Entretanto, a indução de IL-10 e TNF(Fator de Necrose Tumoral)- α foi similar entre os grupos estudados.

Posteriormente, Benard et al. (2001) demonstraram que as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas agudas e crônicas da PCM estimuladas com a gp43 produziam níveis baixos de IL-2 e IFN- γ e quantidades substanciais de IL-10, ao passo que indivíduos sadios sensibilizados com *P. brasiliensis* produziam níveis detectáveis das três citocinas, sendo mais elevados os níveis de IFN- γ e IL-2 em comparação aos pacientes. Além disso, a secreção de IL-2 e IFN- γ foi inversamente correlacionada à quantidade de anticorpos específicos produzidos pelos pacientes e indivíduos sadios sensibilizados. O padrão de citocinas produzidos pelos pacientes com PCM parece ter importância na falta de resposta celular à gp43, com produção de elevados níveis de anticorpos não protetores.

Oliveira et al. (2002) estudaram a resposta proliferativa e produção de citocinas de linfócitos de pacientes com forma aguda e forma crônica da PCM, em comparação aos indivíduos infectados e controles não infectados. Este estudo sugere, como nos anteriores, que a forma aguda seja um polo Th2 caracterizado pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Estes mediadores, associados a baixos níveis de proliferação de linfócitos e de IFN- γ , resultariam na depressão da resposta imune celular com consequente manifestação grave da doença. Por outro lado, os indivíduos apenas infectados, sem a doença, representariam o polo oposto, com proliferação de linfócitos, alta produção de IFN- γ e, paralelamente, baixos níveis de IL-10. Este perfil Th1 poderia levar a uma resposta imune eficiente capaz de prevenir o desenvolvimento da doença. Neste contexto, a forma crônica representaria um padrão intermediário da resposta imune na PCM, situado entre a resposta Th1 da infecção e Th2 de pacientes da forma aguda.

Complementando os estudos sobre secreção de citocinas na PCM, pôde-se documentar a elevada produção de IL-10 e TGF- β em mucosa e gânglios, particularmente neste último órgão, sugerindo a importância destas citocinas na disseminação da doença (Neworal et al., 2003).

As quimiocinas também exercem importante papel na resposta imune à PCM, tendo sido demonstrado em modelo murino que a infecção por *P. brasiliensis* estimula a produção das quimiocinas inflamatórias MCP-1 (ou CCL2; quimiocina C-C ligante 2), MIP-1 α (ou CCL3), RANTES (ou CCL5), KC (ou CXCL1; quimiocina C-X-C ligante 1), MIG (ou CXCL9) e IP-10 (ou CXCL10), bem como induz a expressão dos receptores para quimiocinas CCR(receptor C-C tipo)5 e CXCR(receptor C-X-C tipo)3 no pulmão de camundongos infectados. Além disso, estes mesmos autores observaram que IFN- γ modula a expressão destas quimiocinas e consequentemente a composição do infiltrado leucocitário (Souto et al., 2003).

Na doença humana, frente a estímulo com fitohemaglutinina, foi observado que células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos infectados por *P. brasiliensis* expressam precocemente níveis maiores de mRNA de IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e CXCL10 quando comparados aos pacientes com a forma aguda da PCM. Em relação aos pacientes com a forma crônica, esses indivíduos infectados apresentaram níveis similares de IFN- γ e CXCL10, porém, maiores de CXCL9, que atrai eficientemente linfócitos T ativados. Paralelamente, tanto pacientes com a forma aguda quanto crônica expressaram precocemente maiores níveis de mRNA de citocinas Th2 e T regulatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β) em comparação aos infectados (Mamoni & Blotta, 2005).

Mais recentemente, Castro et al. (2013) relacionaram as formas clínicas da PCM às novas subpopulações de células T, utilizando-se da expressão de citocinas, fatores de

transcrição e análises histopatológicas. Eles observaram que, frente a estímulo com fitohemaglutinina, além da proteção estar relacionada à resposta Th1, a forma aguda está associada não só à Th2, como também à Th9, caracterizada pela ação da IL-9 e da IL-21, resultando na diminuição da ativação de macrófagos e no aumento da resposta humoral. A forma crônica, por sua vez, foi associada às respostas precoces dos tipos Th17 (IL-17 e IL-6) e Th22 (IL-22), com ativação tardia, mas persistente, de células T regulatórias.

Apesar dos grandes avanços na caracterização imunológica das diferentes formas clínicas, não se conhecem os fatores determinantes da evolução da infecção para doença e os fatores reguladores da gravidade da doença.

Neste contexto, entre os aspectos envolvidos, tem relevância a diferenciação de células T $CD4^+$ para as sub-populações Th1, Th2, Th17, T regulatórias entre outras. Possíveis fatores relacionados à regulação de tal diferenciação seriam o microambiente de citocinas, as moléculas co-estimulatórias, a interação do receptor de linfócitos T (TCR) com o complexo peptídeo-MHC (“Major Histocompatibility Complex”; complexo de histocompatibilidade principal), a dose do antígeno e as células apresentadoras de antígeno (APCs) (Hsieh et al., 1992). Estudos de populações de células T clonadas já diferenciadas sugerem que células apresentadoras de antígeno poderiam ter um importante papel em determinar o fenótipo de células T respondedoras (Pfeiffer et al., 1991). Trabalhos utilizando populações de células T clonadas descreveram que linfócitos Th1 eram estimulados preferencialmente quando macrófagos foram utilizados como APCs. Por outro lado, clones do tipo Th2 eram estimulados preferencialmente quando linfócitos B foram utilizados como APCs (Gajewski et al., 1991).

Além de macrófagos e linfócitos B, células dendríticas (DCs) constituem-se em potentes células apresentadoras de antígenos capazes de realizar o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T (Unanue & Allen, 1987).

Presente na maioria dos tecidos, as DCs imaturas capturam e processam antígenos, migrando para os órgãos linfóides periféricos, onde amadurecem e expressam grandes quantidades de complexos MHC-peptídeos e moléculas co-estimulatórias, estabelecendo interação com células T antígeno-específicas. Todas essas atividades das DCs podem ser induzidas por agentes infecciosos e por esta razão são consideradas sentinelas móveis que levam os antígenos às células T para indução da imunidade, conforme descrito por Banchereau & Steinman (1998).

Muitos fatores influenciam a capacidade das DCs em polarizar a resposta de célula T para um padrão Th1 ou Th2. Dentre estes se destaca o subtipo de célula dendrítica, a natureza do estímulo para sua maturação e o microambiente no qual a célula é estimulada (Shortman & Liu, 2002).

Neste sentido, trabalhos *in vitro* têm demonstrado que diferentes subtipos de células dendríticas parecem estimular um padrão distinto de resposta de célula T. Assim, Rissoan et al. (1999) descreveram que culturas de células T, na presença do subtipo de DCs derivadas de monócitos (origem mielóide), produziram grandes quantidades de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Por outro lado, células T cultivadas em presença de DCs, cujos precursores sejam células plasmocitóides e acredita-se que tenham origem linfóide, secretam pouco IFN- γ e altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Estes resultados sugerem que *in vitro* as DCs derivadas de monócitos sejam capazes de induzir a diferenciação de células Th1, enquanto DCs derivadas de células plasmocitóides favoreçam o desenvolvimento de células Th2.

Shortman & Naik (2007), considerando as diferentes respostas dos subtipos de DCs, classificaram essas células em dois grandes grupos: as encontradas *in vivo* e as geradas *in vitro*. Entre os subtipos de DCs *in vivo*, estão as pré-DCs ou DCs precursoras, as DCs convencionais e as DCs inflamatórias. As precursoras não tem características e funções de DCs, mas tem a capacidade de se desenvolverem em DCs de um subtipo específico. As convencionais, por outro lado, já possuem forma e funções de DCs, e são subdivididas em migratórias, levando antígenos da periferia para os linfonodos, e em residentes de tecidos linfóides, atuando como APCs, restritas ao órgão linfóide onde se encontram. Finalmente, dentre as DCs *in vivo*, temos as inflamatórias, definidas assim por se apresentarem em estado inflamatório ou devido a um estímulo microbiano.

As DCs humanas geradas *in vitro* podem ter dois precursores: monócitos e células CD34+. Dependendo do tipo de citocina ou estímulo utilizado, geram-se DCs com características diferentes, podendo variar entre DCs inflamatórias, DCs migratórias ou células de Langerhans, por exemplo.

Durante a apresentação antigênica, a interação entre a DC e o linfócito T virgem, mediada por moléculas de adesão e co-estimulatórias, é fundamental para o início da resposta imune primária. Além das interações ICAM-1/LFA-1 e LFA-3/CD2, foi que um receptor de ICAM-3, denominado DC-SIGN (“DC-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin”), expresso principalmente por DCs, desempenha um importante papel no estabelecimento do primeiro contato com linfócitos T, uma vez que anticorpos anti-DC-SIGN inibiram a proliferação dessas células, induzida por DCs (Geijtenbeek et al., 2000). Atualmente, o DC-SIGN é classificado como um receptor de lectina do tipo C, juntamente com o receptor de manose, tendo sido descrito como importante reconhecedor de espécies fúngicas, tais como *Aspergillus fumigatus* (Serrano-Gómez et

al., 2004), *Candida albicans* (Cambi et al., 2003), *Penicillium marneffei* (Ngaosuwanikul et al., 2008) e *Trichophyton rubrum* (Santiago et al., 2014).

Também têm papel crucial nesta fase de apresentação do antígeno ao linfócito T as quimiocinas, que por serem proteínas quimiotáticas, regulam o tráfego de células nos órgãos linfóides secundários (Baggiolini, 1998; Luster, 1998). A quimiocina CCL18, produzida por DCs e monócitos, tem sido observada em diversos processos, sejam infecciosos, alérgicos ou auto-imunes, devido à sua principal função de atrair linfócitos T ao local de inflamação. Descrita pela primeira vez há quase duas décadas atrás, a CCL18 é também conhecida por outros nomes: quimiocina pulmonar regulada por ativação (PARC; “Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine”), quimiocina CC-1 derivada de células dendríticas (DC-CK1; “Dendritic Cell-derived CC chemokine-1”), quimiocina CC-1 associada à ativação alternativa de macrófagos (AMAC-1; “Alternative Macrophage Activation-associated CC chemokine-1”) e proteína inflamatória de macrófagos-4 (MIP-4; “Macrophage Inflammatory Protein-4”) (Adema et al. 1997; Hieshima et al., 1997).

Em processos infecciosos, a CCL18, produzida por DCs na malária experimental, foi capaz de aumentar a resposta de células T CD8⁺ antígeno-específicas, quando administrada juntamente com vacina de malária, sugerindo o potencial desta quimiocina como adjuvante (Bruna-Romero et al., 2003). Frente a *Candida albicans*, as DCs reduziram a secreção da quimiocina em quase 50 %, em um período de 24 horas (Vulcano et al., 2003). Por outro lado, tubos germinativos de *Aspergillus fumigatus* aumentaram a expressão dos genes de CCL18 e DC-SIGN em DCs co-cultivadas com células de epitélio alveolar (Morton et al., 2014).

A importância das células apresentadoras de antígenos em modelos experimentais e com células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de células

mononucleares do sangue periférico tem sido reconhecida tanto na iniciação como na evolução da resposta imune em doenças infecciosas.

Há mais de vinte anos, Gimenez et al. (1987) já haviam observado o baixo número de células de Langerhans dos pacientes com PCM crônica, sugerindo uma deficiência na apresentação de antígenos com possível papel na hiporeatividade dos linfócitos T na infecção por *P. brasiliensis*. Posteriormente, esses resultados foram confirmados, e não apenas as células de Langerhans, mas também os dendrócitos dérmicos fator XIIIa⁺ estão em menor número nas biópsias de pele e mucosa de pacientes (Pagliari & Sotto, 2002 e 2003; Pagliari et al., 2011).

O papel das células apresentadoras de antígeno na PCM experimental foi investigado por Almeida et al. (1998), em modelo murino de suscetíveis e resistentes, nos quais a gp43 é apresentada por diferentes células conforme o padrão de suscetibilidade. Nos animais resistentes, houve apresentação preferencial por macrófagos e DCs estimulando a produção de citocinas para a resposta via Th1. Por outro lado, em animais suscetíveis, a gp43 foi preferencialmente apresentada por células B ativando células do tipo Th2.

Ainda nesta mesma linha de estudo Almeida & Lopes (2001), observaram que as DCs de camundongos suscetíveis (B10.A) foram menos eficientes que as células dos camundongos resistentes (A/Sn) nos ensaios de proliferação celular. Observaram ainda que, nos animais resistentes, as DCs foram mais eficientes que macrófagos na estimulação e proliferação de linfócitos. Entretanto nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IFN- γ ou IL-2. A baixa eficiência de células dendríticas de camundongos B10.A na estimulação de células T, que secretam citocinas Th1 *in vitro*, sugerem que este efeito possa estar envolvido na progressão da doença *in vivo*.

Este mesmo grupo demonstrou que DCs de camundongos resistentes, ativadas por LPS e cultivadas na presença de gp43 ou de levedura de *P. brasiliensis*, apresentaram uma significativa redução tanto na expressão de moléculas co-estimulatórias quanto na produção de TNF- α e de IL-12. Observaram também que os animais susceptíveis infectados com o fungo, que receberam DCs previamente estimuladas com gp43 e LPS, tiveram um aumento significativo de unidades formadoras de colônia nos pulmões quando comparados aos controles (Ferreira et al., 2004; Ferreira & Almeida, 2006). As DCs desses camundongos, frente ao *P. brasiliensis*, apresentaram fenótipo regulatório, com alta produção de IL-10 associada à expressão de TLR (receptor tipo “Toll”) 2 (Ferreira et al., 2007).

Pina et al. (2013) também estudaram as DCs no modelo murino da PCM e observaram que as células de camundongos susceptíveis apresentam fenótipo mielóide pró-inflamatório que, no co-cultivo com linfócitos, induzem anergia de células T naïve. Diferentemente, as DCs de animais resistentes constituem uma população mista de características mielóide e plasmocitóide, induzindo as respostas efetora e regulatória. Mais recentemente, o mesmo grupo demonstrou a influência de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como Dectina-1 e TLRs, na resposta de células T resultante da ativação de DCs por *P. brasiliensis* (Loures et al., 2015a).

Uma característica das células dendríticas observada por D’Ostiani et al. (2000), foi a sua marcante plasticidade funcional em resposta às diferentes formas de fungos. Em ensaios *in vitro*, as células dendríticas foram capazes de discriminar as leveduras das hifas de *Candida albicans*, que foram internalizadas através de diferentes receptores, e geraram respostas imunes distintas. A endocitose das leveduras ativou células dendríticas com produção de IL-12 e sensibilizou células Th1, enquanto as hifas inibiram estas duas funções induzindo a produção de IL-4.

Nesta mesma linha de investigação, a atividade funcional de células dendríticas do pulmão em resposta aos conídios e hifas de *Aspergillus fumigatus* foi avaliada em camundongos BALB/c por Bozza et al. (2002). No estudo da internalização, receptores e mecanismos fagocíticos distintos foram identificados para as diferentes formas do fungo. Quando os receptores de lectina tipo C (receptor de manose e CD205/DEC205) e opsoninas-dependentes (CR3, FcγRII e III) foram bloqueados, observou-se uma inibição da internalização de conídios e hifas, respectivamente. Além disso, semelhantemente aos resultados encontrados com *C. albicans*, a fagocitose dos conídios induziu à produção de IL-12 e a de hifas, à produção de IL-4 e IL-10.

O direcionamento para a resposta Th1 após a fagocitose de conídios de *A. fumigatus* foi observado também por Gafa et al. (2006), que notaram maturação completa e maior expressão de CCR7 pelas DCs. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que essas células secretavam quimiocinas responsáveis pela mobilização de polimorfonucleares e células efetoras de memória (Gafa et al., 2007).

Mais recentemente, Loures et al. (2015b) demonstraram que as hifas de *A. fumigatus* interagem com DCs plasmocitóides via Dectina-2, mas não Dectina-1, induzindo secreção de IFN- α e TNF- α , e atividade antifúngica.

O papel das células dendríticas como iniciadoras e moduladoras da resposta imune na coccidioidomicose foi estudado por Richards et al. (2002). Geradas a partir de monócitos de pacientes com coccidioidomicose disseminada e não respondedores ao antígeno de *Coccidioides immitis*, as células dendríticas desses indivíduos foram pulsadas com antígeno coccidióidico e induziram proliferação de linfócitos. Estes resultados mostram que as DCs tem capacidade de estimular resposta imune específica de pacientes não respondedores ao antígeno coccidióidico *in vitro*. Resultados

semelhantes foram obtidos com manoproteínas de *Cryptococcus neoformans* (Pietrella et al., 2005) e *C. albicans* (Pietrella et al., 2006).

Posteriormente, Nesbit et al. (2010) estudaram as respostas e os fenótipos dos linfócitos T polifuncionais de indivíduos imunes e de não-imunes, assim classificados de acordo com a produção de IFN- γ e TNF- α pelas PBMCs frente ao antígeno coccidióidico em um período de 24 horas. Os linfócitos T polifuncionais, produtores simultaneamente de IL-2, IFN- γ e TNF- α , estavam em maior número entre as PBMCs de indivíduos imunes em relação aos não-imunes. Em co-cultivo com DCs estimuladas com o antígeno de *Coccidioides*, porém, não foi observado aumento no número de células e sim, na produção de IL-2 e IFN- γ .

Nesse contexto, essas células poderiam ser usadas para selecionar antígenos como candidatos para o desenvolvimento de vacinas e para uso no tratamento das infecções fúngicas como terapia alternativa.

A imunodepressão antígeno-específica observada nos ensaios de linfoproliferação, bem como o predomínio de citocinas do tipo Th2 nas formas graves da doença estimula o estudo do papel das DCs na possível modulação da resposta imune e na progressão da doença. Dessa forma, uma vez que as DCs desempenham papel ímpar na iniciação da resposta imune específica, o estudo de possíveis mecanismos envolvidos no direcionamento da resposta a antígenos de *P. brasiliensis* torna-se de grande interesse.

Considerando a importância das células dendríticas na imunidade adquirida, documentada em camundongos resistentes pela eficiente apresentação de antígenos e estímulo à produção de citocinas de padrão Th1, o presente trabalho propôs-se a investigar seu papel na paracoccidioidomicose humana.

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos *in vitro* de antígenos de *P. brasiliensis* sobre as células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose.

2.2 Específicos

- a) Analisar os efeitos de antígenos de *P. brasiliensis* sobre a ativação *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose;
- b) Comparar as diferenças entre as células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose e indivíduos saudáveis frente aos antígenos de *P. brasiliensis*, com relação à expressão de moléculas de superfície e à produção de citocinas e quimiocinas;
- c) Avaliar o papel de células dendríticas derivadas de monócitos, previamente estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis* e co-cultivadas com linfócitos autólogos, sobre a linfoproliferação e secreção de citocinas nos sobrenadantes de culturas.

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 27 (vinte e sete) pacientes com PCM ativa (PA), 31 (trinta e um) pacientes com PCM tratada (PT) e 39 (trinta e nove) indivíduos sadios para constituição do grupo controle (CO). Os pacientes foram provenientes do Ambulatório de Micoses Sistêmicas ou da Enfermaria da Divisão de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e participaram do estudo voluntariamente (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP - CAPPesq 1087/04), após preenchimento de consentimento informado, de acordo com a resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

3.2 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados:

a. PCM ativa (PA): identificação de *P. brasiliensis* por exame micológico e/ou histopatológico e/ou presença de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* com títulos ≥ 32 (contraimuno eletroforese).

b. PCM tratada (PT): presença de anticorpos anti- *P. brasiliensis* com títulos ≤ 4 , em duas coletas num período de 6 meses, com doença comprovada no passado por identificação do fungo por exame micológico e/ou histopatológico e/ou presença de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* com títulos ≥ 32 (contraimuno eletroforese).

c. Grupo controle (CO): indivíduos considerados sadios sem história prévia da doença, não sensibilizados em ensaios de linfoproliferação frente à glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis* e ausência de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* (imunodifusão).

Foram excluídos pacientes com comorbidade como tuberculose, neoplasias e outras doenças infecciosas sistêmicas agudas e crônicas, como histoplasmose, aspergilose e leishmaniose.

Tabela 1. Distribuição dos 58 pacientes com paracoccidioidomicose ativa (PA) e tratada (PT), e dos 39 indivíduos sadios (CO), segundo sexo, idade, grupo e formas clínicas, aguda (AG) ou crônica (CR)

	Sexo (%)	Idade (anos ± DP) ^a	Grupos (n)				
			CO (39)	PA (27)		PT (31)	
				AG	CR	AG	CR
Masculino	87,5%	45,6±13,6	30	2	24	3	24
Feminino	12,5%	45,2±10,2	9	0	1	0	4
Total - n			39	2	25	3	28

^aMédia de idade em anos $\pm$ desvio padrão

3.3 Obtenção da gp43 (glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis*)

A purificação de gp43 foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando resina conjugada a anticorpo monoclonal murino anti-gp43 (Camargo et al., 1988). Para tanto, exoantígeno de leveduras de *P. brasiliensis* da cepa B-339 foi aplicada à coluna e após exaustiva lavagem com PBS, o material adsorvido à coluna foi eluído com tampão de ácido cítrico 0,1 M, pH 2,8 e o pH do material rapidamente neutralizado pela adição de TRIS 1 M. O material foi concentrado por ultrafiltração em membrana de 10 kDa, a

concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e verificada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A gp43 foi mantida a -70 °C até o uso.

3.4 Preparo de CFA (“Cell-Free Antigen” de *P. brasiliensis*)

Foi utilizado como antígeno o CFA, conforme descrito por Camargo et al. (1991). As células de culturas de *P. brasiliensis* cepa 339, em 3 dias em meio Agar Fava Netto a 35 °C foram transferidas com auxílio de alça de platina para microtubos com capacidade para 1,5 mL, contendo 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco). Os microtubos foram agitados em vórtex por 2 minutos e, logo em seguida, centrifugados a 12 857 *g* por 10 minutos. O sobrenadante obtido será separado e armazenado a -70 °C para posterior utilização e denominado de “Cell-Free Antigen” (Antígeno solúvel livre de células).

3.5 Diferenciação das células dendríticas derivadas de monócitos

Para a obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (DCs), os protocolos de Sallusto & Lanzavecchia (1994) e Romani et al. (1994) foram utilizados com adaptação. Cerca de 80 mL de sangue total de pacientes e indivíduos sadios foram diluídos à proporção de 1:2 em meio RPMI 1640 (Gibco) e as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) densidade $1.077 \approx 1.078$ (centrifugação a 1250 *g* por 20 minutos a 10 °C). Após dois ciclos de lavagem (centrifugação a 300 *g* por 10 minutos a 10 °C), as células mononucleares foram ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL e incubadas em

meio RPMI 1640 (Gibco) a 37 °C e 5 % de CO₂ por duas horas em placas de seis poços (Costar), acrescentando-se 1,5 mL da suspensão celular/poço. Após incubação, células não-aderentes foram retiradas e as células aderentes foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 40 mg/mL de gentamicina (Novafarma), 200 mM de L-glutamina (Gibco) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco), contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4 recombinantes (PeProtech). No dia três, as culturas receberam reforço das citocinas recombinantes em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-glutamina (Gibco) e soro fetal bovino (Gibco).

3.6 Estímulo das células dendríticas derivadas de monócitos

Ao dia seis do ensaio, as DCs diferenciadas a partir de monócitos aderidos à placa de cultura (CD11c⁺/CD1a⁺/CD14⁻) foram contadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 40 mg/mL de gentamicina (Novafarma), 200 mM de L-glutamina (Gibco) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco), contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4 recombinantes (PeProtech), e ajustadas à concentração de 1x10⁶ células/mL em placas de 24 poços (Costar; volume final de 1 mL/poço). As DCs foram estimuladas com os antígenos de *P. brasiliensis*, gp43 e CFA, com ou sem 50 ng/mL de TNF- α (PeProtech), ou deixadas sem tratamento, e mantidas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 horas.

Para a padronização das concentrações dos dois antígenos utilizados, um pequeno grupo de indivíduos saudáveis (n=4) e pacientes com PCM tratada (n=4) foram estudados sob os estímulos de gp43 a 2; 5 e 10 μ g/mL e o CFA a 2; 5 e 15 μ g/mL. Uma vez

escolhidas as concentrações, as culturas de células foram estimuladas com os antígenos e mantidas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 horas.

No 7º dia, as células foram marcadas para análise da expressão de moléculas de superfície com o anticorpo anti-molécula de interesse, e os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -70 °C para posterior dosagem das citocinas IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IL-1β (BD Biosciences), e da quimiocina CCL-18 (R&D Systems).

3.7 Caracterização das células dendríticas derivadas de monócitos

No dia oito das culturas, as DCs foram recuperadas e ressuspensas em solução de PBS com 1 % de soro fetal bovino (Gibco), e os sobrenadantes congelados para posterior dosagem de citocinas. As células foram ajustadas à concentração de 1×10^5 células/100 µL em microtubos, um para cada dupla de anticorpos anti-molécula de superfície. As DCs foram caracterizadas através da análise da expressão dos seguintes anticorpos anti-molécula de expressão humana marcados com os fluorocromos FITC ou PE, nas quantidades recomendadas pelos respectivos fabricantes: anti-CD11c-FITC, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD1a-PE, anti-CD86-FITC, anti-CD80-PE, anti-CD14-FITC (Caltag) ou anti-DC-SIGN-PE (R&D Systems), além dos controles de isótipos, IgG1-FITC e IgG1-PE.

Os microtubos com as células adicionadas de anticorpos foram incubados a 4 °C e protegidos de luz por 30 minutos. O excesso de anticorpos não ligados às células foi retirado com três ciclos de lavagens com solução de PBS com 1 % de soro fetal bovino (Gibco) e centrifugação de 300 g por 10 minutos. As DCs foram finalmente ressuspensas em solução fixadora de PBS com 2 % de glicose (Sigma) e 1 % de

formaldeído (Merck) e mantidas a 4 °C até aquisição em citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences).

Para a análise no citômetro de fluxo, as células foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos e ressuspensas em tampão PBS. Os resultados obtidos foram analisados em “software” CellQuest (BD Biosciences) e representados pela porcentagem de células positivas e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) para cada molécula estudada.

3.8 Proliferação de linfócitos autólogos em co-cultivo com células dendríticas derivadas de monócitos

As DCs estimuladas ou não com antígenos de *P. brasiliensis*, com ou sem TNF- α , foram co-cultivadas com linfócitos autólogos, previamente separados e congelados a -70 °C após a aderência dos monócitos.

Para o ensaio de proliferação, as DCs, previamente irradiadas com 15 Greys de uma fonte de ^{60}Co , na concentração de 4×10^4 células/poço (1×10^5 células/mL), foram co-cultivadas com linfócitos autólogos na concentração de 2×10^5 células/poço (5×10^5 células/mL; 1 DC : 5 linfócitos; proporção escolhida após o teste de 1:10 e 1:20), em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 40 mg/mL de gentamicina (Novafarma), 200 mM de L-glutamina (Gibco) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco), em placas de 96 poços (Costar; volume final de 200 μL /poço). As culturas foram mantidas a 37 °C e 5 % de CO_2 , por seis dias com adição de 0,5 μCi /poço de timidina- $[\text{}^3\text{H}]$ (2,5 μCi /mL), oito horas antes do término da cultura.

A contagem da radiação β foi realizada no contador Beta Plate (Amersham). A média aritmética das triplicatas, subtraída a contagem do controle sem estímulo, em

cpm (contagens por minuto) foi considerada para a análise dos resultados (δ cpm). Foi considerado positivo, quando o índice de estimulação (cpm teste/cpm controle) foi igual ou maior a 2,0.

Paralelamente, as DCs foram co-cultivadas com linfócitos durante 144 horas e o sobrenadante de cultura foi coletado e estocado a -70 °C até o uso. As concentrações das citocinas TNF- α , IL-4, IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes foram determinadas por ELISA utilizando-se anticorpos específicos.

3.9 Proliferação de células mononucleares de sangue periférico frente aos antígenos de *P. brasiliensis*

A proliferação das PBMCs frente aos antígenos de *P. brasiliensis* consistiu na separação dessas células por gradiente de densidade, conforme descrito no item 3.5. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 40 mg/mL de gentamicina (Novafarma), 200 mM de L-glutamina (Gibco) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco).

As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan (Sigma), acertando-se a concentração para 2×10^6 células/mL. Foram preparadas duas placas de 96 poços (Costar), sendo uma de 72 horas de cultivo estimulada com o mitógeno fitohemaglutinina a 5 μ g/mL (PHA; Sigma) e outra de 144 horas de cultivo estimulada com os antígenos gp43 a 1 μ g/mL e CFA a 2 μ g/mL e a 5 μ g/mL, em triplicatas, com volume final de 200 μ L/poço. Todas as culturas foram mantidas nos períodos determinados em incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂.

A resposta proliferativa foi verificada pela incorporação da timidina triciada [^3H] (2,5 $\mu\text{Ci/mL}$) nas últimas oito horas de cultura, verificada em contador de radiação beta. Para a análise dos resultados, foi considerada a média aritmética das contagens por minuto (cpm) da triplicata de células com cada estímulo (antígenos e PHA) subtraída do valor obtido da média aritmética das com da triplicata de células não-estimuladas (PBMC+Meio).

3.10 Detecção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de cultura de células

3.10.1 Detecção das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ e TNF- α em sobrenadantes de cultura de células

A detecção dos níveis de citocinas IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ e TNF- α (BD Biosciences) em sobrenadante de cultura foi realizada em ensaio de ELISA, utilizando-se anticorpos específicos para captura e detecção destas substâncias, segundo as recomendações do fabricante.

Os anticorpos monoclonais de captura anti-citocinas humanas (específicos para cada citocina) foram diluídos 1:250 em tampão Carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5 e aplicados 50 μL /poço em microplaca de meia-área de 96 poços (Corning). A microplaca foi selada e incubada por 18 horas a 4 °C.

A microplaca foi aspirada e lavada três vezes com PBS com 0,05 % de Tween-20 (Sigma), pH 7,2 $\approx$ 7,4; e após a última lavagem, a microplaca foi invertida e batida levemente sobre papel absorvente para remover resíduos. Os poços foram bloqueados

com 150 µL/poço de PBS com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), pH 7,0 e incubados por uma hora a temperatura ambiente.

Após esse intervalo, o procedimento de lavagem citado foi repetido. As amostras foram diluídas 1:2 em PBS com 10 % de soro fetal bovino (Gibco) e estas aplicadas 50 µL/poço, em duplicata. A curva padrão recomendada tem seu ponto mais alto em 500 pg/mL para IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF- α , 1000 pg/mL para IFN- γ e 2000 pg/mL para IL-12p40, com seis pontos em diluição seriada; as diluições foram aplicadas 50 µL/poço em duplicata de cada concentração, e 50 µL/poço em duplicata de PBS com 10 % soro fetal (Gibco) como um dos controles (“branco”) da reação. A microplaca foi incubada por duas horas a temperatura ambiente.

Passadas duas horas, o procedimento de lavagem foi repetido, cinco vezes. Para IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ e TNF- α , os anticorpos monoclonais biotinilados de detecção anti-citocinas humanas foram diluídos 1:250 em PBS com 10 % de soro fetal bovino (Gibco) e nesta solução, a estreptoavidina-HRP (estreptoavidina-*horseradish* peroxidase conjugada), também a 1:250. A solução foi aplicada 50 µL/poço e a microplaca foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Para IL-1 β , o anticorpo monoclonal biotinilado anti-IL-1 β humana de detecção foi diluído 1:250 em PBS com 10 % de soro fetal bovino e aplicado 50 µL/poço; a microplaca foi incubada por uma hora.

Para IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ e TNF- α , o procedimento de lavagem foi repetido, sete vezes, deixando os poços com o tampão de 30 segundos a 1 minuto entre cada lavagem. Para IL-1 β , a estreptoavidina-HRP foi diluída 1:250 em PBS com 10 % de soro fetal bovino e aplicados 50 µL/poço; a microplaca foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, repetindo o procedimento de lavagem, sete vezes, ao final do intervalo de tempo determinado.

Foram adicionados 50 µL/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (Zymed) e a microplaca foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz. Foram então adicionados 25 µL/poço de H₂SO₄ 2 N para parar a reação e a leitura da absorbância da microplaca realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, subtraída desse resultado, o valor a 570 nm.

Os resultados são automaticamente calculados pelo “software” SoftMax Pro, em “pg/mL”.

3.10.2 Detecção da quimiocina CCL18 em sobrenadantes de cultura de células

Os procedimentos realizados para o ensaio de dosagem da quimiocina humana CCL18 foram recomendados pelo fabricante (R&D Systems).

O anticorpo monoclonal anti-CCL18 humana de captura foi diluído em PBS pH 7,2 ≈ 7,4 à concentração final de 1 µg/mL e aplicados 50 µL/poço à microplaca de 96 poços (Corning). A microplaca foi incubada por 18 horas à temperatura ambiente.

A microplaca foi aspirada e lavada com PBS com 0,05 % de Tween-20 (Sigma) pH 7,2 ≈ 7,4 por três vezes; ao final da última lavagem e aspiração, inverteu-se a microplaca e bateu-se levemente sobre papel absorvente para remover resíduos. Os poços foram bloqueados com 150 µL/poço de PBS com 1 % de albumina sérica bovina (Sigma) pH 7,2 ≈ 7,4 e incubados por no mínimo uma hora a temperatura ambiente.

O procedimento de lavagem e aspiração da microplaca foi repetido. As amostras foram diluídas 1:4 em PBS com 1 % de albumina sérica bovina e aplicados 50 µL/poço,

em duplicata. A curva padrão recomendada tem seu ponto mais alto em 500 pg/mL e seis pontos em diluição seriada com PBS com 1 % de albumina sérica bovina; para cada diluição foram aplicados 50 µL/poço em duplicata de cada concentração, e 50 µL/poço em duplicata de PBS com 1 % de albumina sérica bovina como “branco” da reação. A microplaca foi incubada por duas horas a temperatura ambiente.

Após as duas horas, o processo de lavagem e aspiração da microplaca foi repetido. O anticorpo monoclonal biotilado anti-CCL18 humana foi diluído em PBS com 1 % de albumina sérica bovina à concentração final de 50 ng/mL e aplicados 50 µL/poço desta solução. A microplaca foi incubada por duas horas a temperatura ambiente.

Passadas duas horas, o processo de lavagem e aspiração da microplaca foi repetido. A estreptoavidina-HRP foi diluída 1:250 em PBS com 1 % de albumina sérica bovina, aplicados 50 µL/poço desta solução e a microplaca, incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Ao final desse intervalo de tempo, o processo de lavagem e aspiração foi repetido, foram aplicados 50 µL/poço de substrato TMB e peróxido de hidrogênio (Zymed) e a microplaca, incubada por mais 20 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz.

Foram adicionados 25 µL/poço de H₂SO₄ 2 N e realizada a leitura da absorbância da microplaca em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm e subtraído desse resultado, o valor a 570 nm.

Os resultados são automaticamente calculados pelo “software” SoftMax Pro, em “ng/mL”.

3.11 Análises dos resultados

Para a observação de resultados estatisticamente significantes, utilizou-se a análise de variâncias (“One way-ANOVA”), seguida do pós-teste de Bonferroni para as diferenças entre os grupos, e o teste *t* de Student não-pareado para a comparação entre células não-tratadas e tratadas com PHA, calculados no “software” GraphPad-Prism 5. Os resultados foram representados como média com SEM (erro padrão da média), e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.12 Esquema geral dos experimentos

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

4. RESULTADOS

4.1 Padronização dos ensaios de diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos

Com o objetivo de padronizar o protocolo de diferenciação de células dendríticas (DCs), experimentos preliminares foram realizados no sentido de avaliar a capacidade de diferenciação de DCs a partir de monócitos bem como reconhecer o perfil de células dendríticas não-tratadas (nDC), CD11c⁺, CD1a⁺, CD14⁻, e células ativadas por TNF- α (DC+TNF), CD11c⁺, HLA-DR^{high}, CD86^{high} e CD14⁻. Para tanto avaliamos a expressão de moléculas de superfície características e constitutivas das DCs, quais sejam CD11c, CD1a e HLA-DR, e posteriormente, as co-estimulatórias CD86 e CD80, e DC-SIGN.

A Figura 1 ilustra o perfil celular típico obtido por citometria de fluxo, em análise de “density plot” com relação às características de tamanho (eixo de abscissas) e granulosidade (eixo de ordenadas). Observa-se a presença de pelo menos duas populações distintas, uma delas menor e menos granulosa, constituída por restos celulares e linfócitos, e, em destaque, uma população de células maiores e mais granulosa, apresentando características de monócitos. Esta população foi definida como nossa população de estudo, delineada pela área R1 (“gate”), sendo que para os experimentos foi considerado um mínimo de 10 000 (dez mil) eventos presentes nesta população.

Também foi analisada a expressão de marcadores celulares, representados sob a forma de percentual de células positivas (Figura 2A) e Intensidade Média de

Fluorescência (IMF) (Figura 2B). A Figura 2 ilustra um resultado representativo de experimentos realizados com células de três indivíduos saudáveis (variação <10 %).

Observa-se que células expressando a molécula CD11c, característica de DCs de origem mielóide, constituem quase que a totalidade da população estudada (no mínimo 70% do total de células presentes no “gate”), tanto de nDC quanto de DC+TNF. Além disso, observou-se a presença de uma pequena quantidade de células positivas para CD14 (<5 %), expresso por monócitos, mas ausente em células dendríticas, refletindo a presença de algumas células que não sofreram diferenciação. Tomados em conjunto, considerando a expressão de CD11c e HLA-DR, e baixa expressão de CD14, estes resultados demonstram que houve uma diferenciação expressiva (>90 %) de células dendríticas a partir dos monócitos de sangue periférico.

A análise da intensidade média de fluorescência (IMF) para estes marcadores demonstra que a presença de TNF- α leva ao aumento da expressão da molécula MHC-classe II, para a qual foi utilizado anticorpo anti-HLA-DR, observou-se a expressão desta molécula em cerca de 80 % das células analisadas. Além disso, também se observou aumento tanto na porcentagem de células positivas quanto na IMF da molécula CD86 após o tratamento com TNF- α .

Figura 1: Perfil em citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico de indivíduo sadio

Perfil característico de populações celulares presentes na cultura de células dendríticas derivadas de monócitos em análise por citometria de fluxo, segundo características de tamanho (abscissa) e granulosidade (ordenada). A população delineada pela área R1 (“gate”) representa células com características de monócitos, considerada como população de estudo.

Figura 2: Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos.

A. Análise de percentual de células positivas e **B.** IMF para os marcadores CD11c, CD86, HLA-DR e CD14, analisadas em população definida na área R1 (“gate”). Células não-tratadas (nDC) originam-se de monócitos estimulados para diferenciação em células dendríticas, obtidas no 6^o dia de cultura e sem aplicação de outro tratamento e, quando tratadas com TNF- α por 48 horas, se tornam células ativadas (DC+TNF). Resultados de um indivíduo sadio (representativo de três experimentos isolados de três indivíduos sadios, com variação <10 %).

4.2 Padronização das concentrações dos antígenos de *P. brasiliensis* para estímulo de células dendríticas

4.2.1 Determinação da concentração de gp43

Após a incubação de 1×10^7 células/poço por duas horas, as células aderentes foram mantidas em cultivo durante cinco dias para a diferenciação em células dendríticas. No quinto dia, as células diferenciadas ($CD11c^+$, $CD1a^+$, $CD14^-$) foram divididas em não-tratadas (nDCs, sem $TNF-\alpha$) e tratadas (DC+TNF, com $TNF-\alpha$), e estimuladas com gp43 nas concentrações de 2; 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$.

Na Figura 3, estão ilustrados os efeitos de diferentes concentrações de gp43 sobre o fenótipo das DCs de um paciente com PCM tratada (resultado representativo de três experimentos isolados de três pacientes, com variação $<10\%$). Na Figura 3A, observa-se que o percentual de células positivas para a molécula HLA-DR parece sofrer um efeito dose-resposta, aumentando principalmente com a concentração de gp43 a 5 $\mu\text{g/mL}$ tanto nas nDCs quanto nas DC+TNF. Esse efeito é observado também na molécula CD86, porém não foi observado em CD11c, para o qual a positividade é mais baixa nas DC+TNF não-estimuladas e nas DC+TNF estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/ml}$ (DC+TNF+Gp2), quando comparadas às nDCs.

Em relação à IMF (Figura 3B), observou-se que as concentrações de 5 (Gp5) e 10 $\mu\text{g/ml}$ (Gp10) exercem efeitos semelhantes, tanto sobre células tratadas com $TNF-\alpha$ quanto não tratadas, aumentando a fluorescência das moléculas HLA-DR e CD86, e diminuindo em CD11c. Não foram observadas diferenças na expressão de DC-SIGN.

Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de gp43 na expressão das moléculas de superfície de células dendríticas de paciente com PCM tratada.

A. Percentual de células positivas e B. IMF de CD11c, HLA-DR, CD86 e DC-SIGN em células dendríticas não-estimuladas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/ml (Gp2), 5 μ g/ml (Gp5) e 10 μ g/ml (Gp10) de um paciente com PCM tratada, após 48 horas de cultivo (resultados representativos de três experimentos isolados com variação <10 %).

4.2.2 Determinação da concentração de CFA

Assim como para a gp43, o mesmo experimento foi realizado para se observar os efeitos de diferentes concentrações de CFA sobre o fenótipo das DCs de pacientes com PCM tratada (um resultado representativo de experimentos realizados com células de três pacientes, com variação <10 %), e ilustrado na Figura 4. Os percentuais de células positivas para as moléculas CD11c e CD86 são elevados à medida que se aumenta a concentração do antígeno nas DC+TNF. Esse efeito não é observado para as moléculas HLA-DR e DC-SIGN. As nDC em contato com todas as concentrações de CFA tem a positividade de CD11c reduzida (Figura 4A).

Na Figura 4B, é possível observar que o CFA causa efeito dose-resposta sobre CD86, sendo que a expressão dessa molécula é especialmente aumentada quando as DC+TNF são estimuladas com CFA a 15 µg/mL (DC+TNF+CFA15), permanecendo semelhantes nas demais concentrações.

Dessa maneira, tendo em vista as variações do fenótipo das DCs sob o efeito de diferentes concentrações dos antígenos, optou-se pela dose de 5 µg/ml de gp43 e 15 µg/ml de CFA. A concentração de gp43 a 2 µg/ml também foi utilizada quando se obteve número excedente de DCs diferenciadas.

Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de CFA na expressão das moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos de paciente com PCM tratada. A. Percentual de células positivas e **B.** IMF de CD11c, HLA-DR, CD86 e DC-SIGN em células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com CFA a 2 $\mu\text{g/ml}$ (CFA2), 5 $\mu\text{g/ml}$ (CFA5) e 15 $\mu\text{g/ml}$ (CFA15) de um paciente com PCM tratada, após 48 horas de cultivo (resultados representativos de três experimentos isolados com variação <10 %).

4.2.3 Proliferação de células mononucleares de sangue periférico frente aos antígenos de *P. brasiliensis*

Com o objetivo de comparar a resposta proliferativa de linfócitos observada frente às DCs previamente estimuladas àquela da linfoproliferação clássica frente aos antígenos de *P. brasiliensis*, as PBMC de pacientes com paracoccidioidomicose tratada (PT) ou ativa (PA), e de indivíduos saudáveis (CO) foram cultivadas com gp43 a 1 µg/mL (Gp1) e CFA a 2 µg/mL (CFA2) e a 5 µg/mL (CFA5) por 144 horas. As células também foram estimuladas com PHA por 72 horas, ou deixadas sem estímulo em meio RPMI para verificação da proliferação basal. Os resultados foram representados como a média das triplicatas das culturas estimuladas subtraídas da média das triplicatas das culturas sem estímulo, com o erro padrão da média (SEM).

A concentração da gp43 a 1 µg/mL é rotineiramente utilizada em nosso laboratório, sendo padronizada em ensaios prévios, utilizando-se as mesmas condições de cultivo. Foram testadas as concentrações de 2, 5 e 15 µg/mL do CFA, sendo a maior descartada por provocar resultados similares aos observados com o uso de 5 µg/mL.

Na Figura 5A, estão representados os resultados dos ensaios de linfoproliferação frente à PHA. Pode-se observar que as PBMC dos três grupos CO, PT e PA apresentaram resultados semelhantes quando estimuladas com PHA e este estímulo induziu proliferação significativamente maior em relação aos mesmos grupos sem estímulo.

Na Figura 5B, estão representados os resultados dos ensaios de linfoproliferação frente aos antígenos de *P. brasiliensis*. Podemos observar que as células do grupo PT proliferaram significativamente mais que as do grupo CO quando estimuladas com gp43

a 1 µg/mL (PBMC+Gp1; $p < 0,01$), CFA a 2 µg/mL (PBMC+CFA2; $p < 0,01$) e CFA a 5 µg/mL (PBMC+CFA5; $p < 0,001$). A diferença foi também significativa na comparação entre os grupos PT e PA sob o estímulo de Gp1 ($p < 0,05$). Em nenhum dos estímulos testados, porém, houve diferenças entre os grupos CO e PA.

Conforme se observa à Figura 5B, as células de todos os grupos (PT e PA, $p < 0,01$; CO, $p < 0,001$), quando estimuladas com a maior concentração de CFA (PBMC+CFA5), proliferaram significativamente mais que as não-estimuladas (PBMC+Meio).

O estímulo de CFA a 2 µg/mL (PBMC+CFA2) também induziu maior proliferação das células do grupo CO e o estímulo de gp43 a 1 µg/mL (PBMC+Gp1) no grupo PT, em comparação a PBMC+Meio ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 5: Proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

A. PBMC estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) durante 72 horas de cultivo; diferenças estatisticamente significantes $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em relação a PBMC+Meio. **B.** PBMC estimuladas com gp43 a 1 $\mu\text{g/mL}$ (Gp1), e CFA a 2 $\mu\text{g/mL}$ (CFA2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (CFA5), de 17 indivíduos saudáveis (CO), 8 pacientes com doença ativa (PA) e 12 pacientes tratados (PT), durante 144 horas de cultivo. Resultados representados como média com SEM de δ cpm decorrente da incorporação de timidina- ^3H nas últimas 8 horas de cultivo. Diferenças estatisticamente significantes indicadas pelas chaves $^+p < 0,05$; $^{++}p < 0,01$ ou $^{+++}p < 0,01$ na comparação entre grupos; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ ou $***p < 0,001$ na comparação com PBMC+Meio.

4.3 Comparação entre grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com PCM da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas frente aos antígenos de *P. brasiliensis*

Após a padronização dos protocolos de diferenciação e ativação das DCs derivadas de monócitos, e escolha das concentrações dos antígenos de *P. brasiliensis*, procedeu-se à análise dos efeitos do fungo sobre a expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo, comparando-se a porcentagem de células positivas e a Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de cada molécula estudada entre os grupos de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes com PCM tratada (PT).

Foram estudadas as expressões de moléculas de superfície presentes nas membranas de DCs: CD11c e CD1a, que caracterizam as DCs de origem mielóide, o MHC-classe II, HLA-DR, e as moléculas co-estimulatórias CD86, CD80 e DC-SIGN.

4.3.1 Expressão da molécula CD11c

Na Figura 6, estão representados os resultados observados na análise da expressão da molécula CD11c. Não encontramos diferenças significativas nos percentuais de células positivas para a molécula tanto entre os diferentes grupos estudados quanto entre os estímulos utilizados (Figura 6A). Comprovou-se, porém, que as células-alvo do trabalho foram as células dendríticas derivadas de monócitos pela elevada porcentagem média de positividade de CD11c expressa pelas DCs não tratadas (nDC; >70 %) e expressão <5 % de CD14 (molécula característica de monócitos; dados não mostrados).

Observou-se que, embora na Figura 6B se note que a IMF de CD11c do grupo PT seja diferente de CO e PA, tanto nas nDC quanto nas DC+TNF estimuladas com gp43 a 2 µg/mL (Gp2) e CFA a 15 µg/mL (CFA), não se demonstra tal superioridade na análise estatística. Interessantemente, a gp43 em maior concentração (Gp5) parece não exercer efeito sobre a expressão de CD11c, que foi semelhante tanto em DC+TNF quanto nDC de todos os grupos, quando comparadas às células não estimuladas (Figura 6B).

• **CD11c**

Figura 6: Expressão da molécula CD11c.

A. Percentual e **B.** IMF de células dendríticas CD11c positivas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes tratados (PT). Resultados representados como média com SEM.

4.3.2 Expressão da molécula CD1a

No estudo da expressão da molécula CD1a (Figura 7A), não se observaram diferenças significantes entre os grupos quanto à porcentagem de células positivas, embora o grupo CO tenha apresentado percentual levemente mais elevado que os outros grupos.

Quanto à IMF, as DC não-tratadas (nDC) do grupo PT expressaram mais CD1a que as estimuladas com os antígenos gp43 a 5 µg/mL e CFA a 15 µg/mL, sem TNF- α ($p < 0,05$; Figura 7B). Essa diferença, por outro lado, não foi observada em relação ao estímulo com a menor concentração de gp43 (Gp2), ou na presença de TNF- α .

• **CD1a**

Figura 7: Expressão da molécula da CD1a.

A. Percentual e **B.** IMF de células dendríticas CD1a positivas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/mL (Gp2) e a 5 μ g/mL (Gp5), e CFA a 15 μ g/mL (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes tratados (PT). Resultados representados como média com SEM. Diferenças estatisticamente significantes indicadas pelas chaves * $p < 0,05$.

4.3.3 Expressão da molécula HLA-DR

A molécula de MHC-classe II estudada, HLA-DR, é essencial na apresentação de frações peptídicas dos antígenos processados pelas DCs, com maior expressão em células amadurecidas e ativadas com TNF- α . Assim, investigou-se o efeito dos antígenos de *P. brasiliensis* sobre a expressão dessa molécula e os resultados estão representados à Figura 8. Observou-se que o percentual de células positivas para a molécula (Figura 8A) foi semelhante em todos os grupos e estímulos estudados (>80 %).

Na Figura 8B, estão representados os resultados na análise da IMF para a HLA-DR. É possível observar que as células dos grupos CO e PA parecem ter comportamento semelhante, sem diferenças evidentes entre si ou entre os estímulos utilizados. As do grupo PT, por outro lado, parecem expressar mais a molécula em todas as situações, apesar dessa diferença ter sido significativa apenas em relação ao grupo PA sob o estímulo de gp43 a 5 $\mu\text{g/mL}$, na presença ou não de TNF- α ($p < 0,05$; nDC+Gp5 e DC+TNF+Gp5).

• HLA-DR

Figura 8: Expressão da molécula HLA-DR.

A. Percentual e **B.** IMF de células dendríticas HLA-DR positivas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes tratados (PT). Resultados representados como média com SEM. Diferenças estatisticamente significativas indicadas pelas chaves $^+p < 0,05$ na comparação entre grupos.

4.3.4 Expressão da molécula CD86

Durante a apresentação do antígeno, as DCs ligam-se aos linfócitos através do complexo MHC-peptídeo e de moléculas co-estimulatórias, CD86 e CD80, que definem o tipo de resposta efetora das células T. Desse modo, investigou-se a expressão dessas duas moléculas frente aos antígenos de *P. brasiliensis*.

Na análise da expressão da molécula CD86, observou-se que DC+TNF apresentam percentuais de positividade mais elevados que as não-tratadas, que seria esperado em função da ativação pela citocina TNF- α . Estas células do grupo PT, na presença de gp43 a 5 $\mu\text{g/mL}$ e de CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (nDC+Gp5 e nDC+CFA), apresentaram percentuais de positividade significativamente maior que as células do grupo CO (Figura 9A).

Na Figura 9B, ilustram-se os resultados da análise da IMF para CD86, onde é possível observar que os resultados foram semelhantes aos de HLA-DR, mas em menor escala de fluorescência e sem diferenças significantes. Os grupos CO e PA parecem expressar CD86 em intensidades muito semelhantes enquanto que as células do grupo PT parecem ter maior expressão, independentemente do estímulo presente (sem diferenças significantes).

• **CD86**

Figura 9: Expressão da molécula CD86.

A. Percentual e **B.** IMF de células dendríticas CD86 positivas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/mL (Gp2) e a 5 μ g/mL (Gp5), e CFA a 15 μ g/mL (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes tratados (PT). Resultados representados como média com SEM. Diferenças estatisticamente significantes indicadas pelas chaves $^+p < 0,05$ na comparação entre grupos.

4.3.5 Expressão da molécula CD80

Juntamente com CD86, a molécula CD80 exerce papel co-estimulatório na ligação entre as DCs e os linfócitos T, participando na definição da resposta efetora contra os antígenos de *P. brasiliensis* apresentados. Faz-se relevante, portanto, a análise da expressão dessa molécula por DCs frente aos antígenos fúngicos.

Foi observado que tanto os percentuais de células positivas para CD80 quanto as intensidades médias de fluorescência (Figura 10A e B, respectivamente) foram reduzidos em todos os tratamentos do experimento. Curiosamente, esses dois parâmetros parecem reduzir ainda mais na presença de TNF- α , sugerindo um papel a ser investigado sobre o efeito dessa citocina sobre a expressão de CD80.

• **CD80**

Figura 10: Expressão da molécula CD80.

A. Percentual e **B.** IMF de células dendríticas CD80 positivas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes tratados (PT). Resultados representados como média com SEM.

4.3.6 Expressão da molécula DC-SIGN

A molécula DC-SIGN tem papel importante na ligação e internalização de partículas antigênicas pelas DCs, e dessa maneira, pode também modular a resposta efetora de linfócitos T. A análise da expressão dessa molécula revelou percentual médio de células positivas mais elevado no grupo CO que nos demais grupos. Além disso, as nDC estimuladas com gp43 (particularmente a de 2 µg/mL) e CFA de pacientes com PCM ativa apresentaram maior positividade que as do grupo PT, porém sem diferenças estatisticamente significantes (Figura 11A).

Na Figura 11B, estão representados os resultados da análise de IMF de DC-SIGN. Comparativamente à porcentagem de células positivas para a molécula, os dados de IMF dos grupos de pacientes com PCM (PA e PT) são maiores que os observados no grupo CO, sendo que a expressão nas células desses indivíduos foi praticamente constante em todos os tratamentos utilizados. Observou-se que o espectro de distribuição de dados foi muito variável nos dois grupos de pacientes frente a todos os estímulos, o que resultou na ausência de diferenças estatisticamente significantes.

• DC-SIGN

Figura 11: Expressão da molécula DC-SIGN.

A. Percentual e **B.** IMF de células dendríticas DC-SIGN positivas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 17 pacientes com PCM ativa (PA) e 22 pacientes tratados (PT). Resultados representados como média com SEM.

4.4 Efeito de antígenos de *P. brasiliensis* na secreção de citocinas por células dendríticas derivadas de monócitos

4.4.1 Níveis da citocina IL-10

Uma vez diferenciadas a partir de dos monócitos, as células dendríticas tratadas ou não com TNF- α foram estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis*, gp43 a 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$, e deixados em cultura por 48 horas. Os sobrenadantes dessas culturas foram separados e neles, dosadas as citocinas IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-1 β e CCL-18.

Na Figura 12, estão representados os resultados da dosagem da citocina IL-10. Observou-se que as nDCs do grupo CO parecem produzir mais a citocina que as células dos grupos de pacientes. Paralelamente, as DC+TNF do grupo CO secretaram mais IL-10 na presença de gp43 a 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ (DC+TNF+Gp2 e DC+TNF+Gp5). Quanto às células de pacientes com PCM tratada (PT), percebe-se que, estimuladas com CFA (nDC+CFA e DC+TNF+CFA), secretam menos IL-10, e inversamente, na presença de gp43 a 5 $\mu\text{g/mL}$ e TNF- α (DC+TNF+Gp5), as células desse grupo produziram significativamente mais a citocina que na ausência da glicoproteína fúngica (DC+TNF; $p < 0,05$).

Figura 12: Níveis da citocina IL-10 em sobrenadantes de cultura de células dendríticas (em pg/mL) não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/mL (Gp2) e a 5 μ g/mL (Gp5), e CFA a 15 μ g/mL (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 23 pacientes com a doença tratada (PT), após 48 horas de cultivo. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL, e diferença estatisticamente significante indicada pela chave * $p < 0,05$ na comparação entre estímulos.

4.4.2 Níveis da citocina IL-12p40

Assim como realizado para IL-10, foi dosada a citocina inflamatória IL-12p40 por ELISA de captura nos sobrenadantes de cultura de DCs tratadas ou não com TNF- α , estimuladas com os antígenos de *P. brasiliensis* por 48 horas.

Como mostrado na Figura 13, células de pacientes com PCM tratada secretam mais IL-12p40 que as células dos grupos CO e PA, produzindo níveis mais elevados quando na presença de TNF- α . Nessa condição, as DC+TNF do grupo PT secretaram significativamente mais a citocina que as células do grupo PA nos tratamentos de gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$; DC+TNF+Gp2) e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$; DC+TNF+CFA), e na ausência de antígenos ($p < 0,01$; DC+TNF). Também foi observada diferença significativa na comparação entre os grupos PT e CO quando as células foram estimuladas com CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ na presença de TNF- α ($p < 0,05$; DC+TNF+CFA).

Figura 13: Níveis da citocina IL-12p40 em sobrenadantes de cultura de células dendríticas (em pg/mL) não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/mL (Gp2) e a 5 μ g/mL (Gp5), e CFA a 15 μ g/mL (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 23 pacientes com a doença tratada (PT), após 48 horas de cultivo. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL, e diferenças estatisticamente significantes indicadas pelas chaves $^+p < 0,05$ e $^{++}p < 0,01$.

4.4.3 Níveis da citocina IL-1 β

Adicionalmente às dosagens de IL-10 e IL-12p40, foi determinada a concentração da citocina inflamatória IL-1 β nos sobrenadantes de culturas de células dendríticas. Como mostrado na Figura 14, os níveis da citocina foram, em geral, muito baixos em todos os tratamentos. Os níveis mais elevados foram observados nas DC+TNF estimuladas com gp43 nas duas concentrações, seguidos do estímulo com CFA nas culturas de pacientes com PCM ativa (PA), porém sem significância estatística.

Figura 14: Níveis da citocina IL-1 β em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/mL (Gp2) e a 5 μ g/mL (Gp5), e CFA a 15 μ g/mL (CFA), de 15 indivíduos saudáveis (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 23 pacientes com a doença tratada (PT), após 48 horas de cultivo. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL.

4.4.4 Níveis da quimiocina CCL18

Foram observadas altas concentrações da quimiocina CCL18 nas células de todos os grupos estudados, como ilustrado a Figura 15. Os grupos CO e PA apresentaram concentrações elevadas frente a todos os estímulos, enquanto o grupo PT apresentou baixos níveis comparativamente aos outros grupos, em particular frente a gp43 a 5 $\mu\text{g/mL}$ (DC+TNF+Gp5). Não foram observadas, porém, diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e os estímulos.

Figura 15: Níveis da quimiocina CCL18 em sobrenadantes de cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 10 indivíduos sadios (CO), 13 pacientes com PCM ativa (PA) e 20 pacientes com a doença tratada (PT), após 48 horas de cultivo. Resultados representados como média com SEM dos níveis em ng/mL.

Tabela 2. Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre as médias de proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) frente aos estímulos de PHA a 5 µg/mL (PBMC+PHA), gp43 a 1 µg/mL (PBMC+Gp1) e de CFA a 2 µg/mL (PBMC+CFA2) ou 5 µg/mL (PBMC+CFA5) em comparação às culturas de PBMCs não-estimuladas (PBMC+Meio), dos grupos de indivíduos sadios (CO), pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT)

Grupo	Culturas		Valor de <i>p</i>
	1	2*	
CO	PBMC+Meio	PBMC+PHA	<0,001
	PBMC+Meio	PBMC+CFA2	<0,001
	PBMC+Meio	PBMC+CFA5	<0,001
PA	PBMC+Meio	PBMC+PHA	<0,01
	PBMC+Meio	PBMC+CFA5	<0,01
PT	PBMC+Meio	PBMC+PHA	<0,001
	PBMC+Meio	PBMC+Gp1	<0,05
	PBMC+Meio	PBMC+CFA5	<0,01

*média com SEM de maior valor

Tabela 3. Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças nas médias de proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) entre os grupos de indivíduos sadios (CO), pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT), frente a gp43 a 1 µg/mL (Gp1) e CFA a 2 µg/mL (CFA2) ou 5 µg/mL (CFA5)

Estímulo	Grupos		Valor de <i>p</i>
	1	2*	
PBMC+Gp1	CO	PT	<0,01
PBMC+Gp1	PA	PT	<0,05
PBMC+CFA2	CO	PT	<0,01
PBMC+CFA5	CO	PT	<0,001

*média com SEM de maior valor

Tabela 4. Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre as culturas de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de pacientes com PCM tratada (PT).

Variável	Culturas		Valor de <i>p</i>
	1	2*	
IMF CD1a	nDC+Gp5	nDC	<0,05
	nDC+CFA	nDC	<0,05
IL-10	DC+TNF	DC+TNF+Gp5	<0,05

*média com SEM de maior valor

Tabela 5. Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os grupos de indivíduos sadios (CO), pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT), segundo a cultura de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA)

Variável	Culturas	Grupos		Valor de <i>p</i>
		1	2*	
IMF HLA-DR	nDC+Gp5	PA	PT	<0,05
	DC+TNF+Gp5	PA	PT	<0,05
% CD86 ⁺	nDC+Gp5	CO	PT	<0,05
	nDC+CFA	CO	PT	<0,05
IL-12p40	DC+TNF	PA	PT	<0,01
	DC+TNF+Gp2	PA	PT	<0,05
	DC+TNF+CFA	CO	PT	<0,05
	DC+TNF+CFA	PA	PT	<0,05

*média com SEM de maior valor

4.5 Co-cultivo de células dendríticas derivadas de monócitos e linfócitos autólogos

Após a caracterização fenotípica por citometria de fluxo e análise das citocinas secretadas por DCs sob diferentes tratamentos, prosseguiu-se para a etapa de proliferação de linfócitos autólogos num período de 120 horas de cultivo para observação da função das DCs como apresentadoras de antígenos de *P. brasiliensis*.

Na Figura 16, observam-se os resultados da padronização dos co-cultivos de DCs e linfócitos autólogos para a determinação da proporção ideal entre os dois tipos celulares dos diferentes grupos estudados. As DCs previamente diferenciadas e estimuladas com gp43 e CFA foram co-cultivadas com os linfócitos autólogos em três proporções 1:5, 1:10 e 1:20 (DC:linfócitos) e a proliferação foi medida pela incorporação da timidina triciada nas últimas oito horas de cultura. Foi selecionada a proporção de 1:5 que resultou nas maiores taxas de proliferação em todos os grupos.

Figura 16: Determinação da proporção células dendríticas/linfócitos autólogos em co-cultivo. Proliferação de linfócitos autólogos (Li) nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:20 frente às células dendríticas não-tratadas (nDC) e previamente tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 2 indivíduos saudáveis (CO), 7 pacientes com PCM ativa (PA) e 4 pacientes tratados (PT), foi observada após 120 horas de cultivo. Resultados representados como média de δ cpm decorrente da incorporação de timidina-[^3H]; $\emptyset$ = não foi feito.

Paralelamente aos co-cultivos de DCs e linfócitos autólogos, foram realizados três controles de proliferação e os resultados estão representados na Figura 17A. Antes da adição dos linfócitos autólogos, as DCs foram irradiadas em fonte de cobalto (^{60}Co) para inativar quaisquer outras células que possam ter permanecido na cultura mesmo após a retirada das não-aderentes. As DCs irradiadas foram então cultivadas em meio de cultura (nDC+Meio) e verificou-se que a proliferação foi mesmo quase indetectável.

Nas outras duas culturas de controle, as células não-aderentes, em sua maioria linfócitos, previamente congeladas após a etapa de aderência de monócitos, foram então descongeladas e cultivadas em meio de cultura (Li+Meio) ou estimulados com fitohemaglutinina (Li+PHA) para verificar a ausência de proliferação inespecífica e a viabilidade dessas células, respectivamente (Figura 17A). A proliferação das células de todos os grupos foi significativamente maior sob o estímulo da PHA em relação a Li+Meio ($p < 0,001$).

Observa-se na Figura 17B que, em geral, os linfócitos de pacientes proliferaram mais que os de indivíduos saudáveis quando suas DCs tratadas ou não com TNF- α foram estimuladas com gp43 e CFA. Entre os pacientes, linfócitos do grupo PT parecem reconhecer melhor a gp43 que as células do grupo PA, sem diferença estatisticamente significativa. Salienta-se que as células de pacientes do grupo PA proliferaram significativamente mais quando o CFA é apresentado pelas DCs, tanto não-tratadas (Li+nDC+CFA; $p < 0,01$) quanto tratadas com TNF- α (Li+DC+TNF+CFA; $p < 0,001$), e quando comparadas aos linfócitos de indivíduos saudáveis (CO) sob o mesmo estímulo ($p < 0,01$).

A comparação entre os tratamentos dados às células dos pacientes do grupo PA revelou que os linfócitos desses pacientes, frente às DCs estimuladas com CFA+TNF- α (Li+DC+TNF+CFA), proliferaram mais que frente às DC+TNF estimuladas com gp43 a 5

$\mu\text{g/mL}$ (Li+DC+TNF+Gp5; $p < 0,05$) e DCs não-estimuladas (Li+DC+TNF; $p < 0,001$). No grupo PT, os linfócitos proliferaram significativamente mais quando em contato com DC+TNF estimuladas com CFA (Li+DC+TNF+CFA) do que na ausência desse antígeno (Li+DC+TNF; $p < 0,05$).

Quando comparamos os ensaios de co-cultivo entre DCs e linfócitos autólogos (Figura 17B) às culturas de PBMCs (Figura 5B), é possível observar que os resultados de proliferação de linfócitos na presença de DCs são maiores, ainda que as condições de cultura sejam diferentes. No co-cultivo, observamos que as células de pacientes do PA proliferaram mais que as do grupo CO frente às DCs previamente estimuladas com CFA, enquanto no grupo PT, não houve essa diferença. Na cultura de PBMCs, por outro lado, apenas as células do grupo PT proliferaram mais que as do grupo CO, tanto frente à gp43 quanto ao CFA.

Figura 17: Proliferação de linfócitos autólogos frente às células dendríticas.

A. Culturas de controle de proliferação: células dendríticas não-tratadas em meio de cultura (nDC+Meio), linfócitos autólogos (Li) em meio de cultura (Li+Meio) e linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (Li+PHA); diferenças estatisticamente significantes $***p < 0,001$ em relação a Li+Meio. **B.** Linfócitos autólogos (Li) em co-cultivo com células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com $\text{TNF-}\alpha$ (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), de 13 indivíduos saudáveis (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 19 pacientes com a doença tratada (PT), após 120 horas de cultivo. Resultados representados como média com SEM de δ cpm decorrente da incorporação de timidina- ^3H . Diferenças estatisticamente significantes indicadas pelas chaves: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ na comparação entre estímulos, e $^{++}p < 0,01$ na comparação entre grupos.

4.6 Secreção de citocinas em co-cultivo de células dendríticas derivadas de monócitos e linfócitos autólogos

4.6.1 Níveis da citocina IL-10

Na etapa anterior, foi observada a linfoproliferação frente às DCs previamente estimuladas com os antígenos de *P. brasiliensis*. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados após 144 horas do cultivo para as dosagens dos níveis de citocinas secretadas.

Na Figura 18, estão representados os níveis de IL-10 nos sobrenadantes do co-cultivo de DCs e linfócitos autólogos. Nas culturas de controle, verificou-se produção significativamente maior da citocina pelas células de todos os grupos estimuladas com PHA em relação às não-estimuladas (Figura 18A). Os níveis de IL-10 foram elevados em co-cultivos de linfócitos e nDC não-estimuladas, diminuindo principalmente nas culturas com DCs estimuladas com gp43 a 2 µg/mL, em todos os grupos.

Nas co-cultivos com nDC e DC+TNF dos grupos CO e PT, as células parecem controlar melhor a produção de IL-10 que no grupo PA frente aos estímulos de gp43 a 2 e 5 µg/mL. Frente às DC+TNF+CFA, porém, as células do grupo PA secretaram mais a citocina que as do grupo CO ($p < 0,05$), enquanto que as do grupo PT mantiveram níveis similares aos observados nos demais tratamentos.

Figura 18: Níveis da citocina IL-10 em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas.

A. Culturas de controle: células dendríticas não-tratadas em meio de cultura (nDC+Meio), linfócitos autólogos (Li) em meio de cultura (Li+Meio) e linfócitos autólogos estimulados com fitohemaglutinina (Li+PHA); diferenças estatisticamente significantes $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, em relação a Li+Meio; **B.** DCs não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA) de 13 indivíduos sadios (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 19 pacientes com a doença tratada (PT), após 144 horas de cultura. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL; diferença estatisticamente significativa indicada pela chave $^+p < 0,05$ na comparação entre grupos.

4.6.2 Níveis da citocina IL-4

Como realizado para a determinação de IL-10, foram dosados os níveis de IL-4 nos sobrenadantes de co-cultivo de DCs previamente estimuladas com gp43 e CFA e linfócitos autólogos, após 144 horas.

Na Figura 19A, nota-se que nas culturas de controle de nDC+Meio de todos os grupos, foram detectados altos níveis de IL-4 (sem diferenças significantes entre os grupos), porém, esse resultado era esperado uma vez que as culturas receberam o estímulo dessa citocina juntamente com GM-CSF para diferenciar as DCs a partir dos monócitos.

Pode se observar que nos co-cultivos de linfócitos e DCs do grupo CO, os níveis de IL-4 foram baixos em todos os tratamentos (Figura 19B). As células dos dois grupos de pacientes secretaram mais a citocina na presença de DC+TNF estimuladas com CFA (Li+DC+TNF+CFA), porém, apenas na comparação entre PT e CO, foi verificada diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Salienta-se ainda que, apesar de não ter sido observada significância estatística, os linfócitos e nDC estimuladas com CFA (Li+nDC+CFA) do grupo PT também secretaram níveis mais elevados dessa citocina, em relação às culturas dos grupos CO.

Figura 19: Níveis da citocina IL-4 em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas.

A. Culturas de controle: células dendríticas não-tratadas em meio de cultura (nDC+Meio), linfócitos autólogos (Li) em meio de cultura (Li+Meio) e linfócitos autólogos estimulados com fitohemaglutinina (Li+PHA). **B.** DCs não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 μ g/mL (Gp2) e a 5 μ g/mL (Gp5), e CFA a 15 μ g/mL (CFA) de 13 indivíduos saudáveis (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 18 pacientes com a doença tratada (PT), após 144 horas de cultura. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL; diferença estatisticamente significativa indicada pela chave $^+p < 0,05$ na comparação entre grupos; ND = níveis não-detectados.

4.6.3 Níveis da citocina IFN- γ

Os níveis da citocina IFN- γ foram determinados nos sobrenadantes do co-cultivo de DCs estimuladas com antígenos de *P. brasiliensis* e linfócitos autólogos, como mostrado na Figura 20.

Nas culturas de controle, verificou-se maior produção de IFN- γ nas culturas estimuladas com PHA em relação às não-estimuladas (Figura 20A).

Foi possível observar que os linfócitos e as DCs não-tratadas e estimuladas com gp43 (Li+nDC+Gp2 e Li+nDC+Gp5) de pacientes com PCM tratada (PT) apresentaram maiores níveis de IFN- γ que as células do grupo CO, com o mesmo tratamento, porém sem significância estatística.

A diferença nos níveis de IFN- γ foi significativa nas culturas com DCs tratadas com TNF- α e estimuladas com CFA (Li+DC+TNF+CFA), na comparação entre os grupos PT e CO. Observou-se ainda que linfócitos e DCs, tratadas ou não com TNF- α , estimuladas com CFA (Li+nDC+CFA e Li+DC+TNF+CFA) dos grupos PA e PT apresentaram significativamente mais IFN- γ que as células em co-cultivo sem o antígeno (Li+nDC e Li+DC+TNF).

Figura 20: Níveis da citocina IFN- γ em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas.

A. Culturas de controle: células dendríticas não-tratadas em meio de cultura (nDC+Meio), linfócitos autólogos (Li) em meio de cultura (Li+Meio) e linfócitos autólogos estimulados com fitohemaglutinina (Li+PHA); diferenças estatisticamente significantes $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em relação a Li+Meio; **B.** DCs não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA) de 10 indivíduos sadios (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 18 pacientes com a doença tratada (PT), após 144 horas de cultura. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL; diferença estatisticamente significativa indicada pela chave $^+p < 0,05$ na comparação entre grupos; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ ou $***p < 0,001$ em relação às DCs sem antígeno (Li+nDC ou Li+DC+TNF); ND = níveis não-detectados.

4.6.4 Níveis da citocina TNF- α

Juntamente com IL-10, IL-4 e IFN- γ , foram determinados os níveis de TNF- α nos sobrenadantes de culturas de linfócitos e DCs estimuladas com os antígenos de *P. brasiliensis*, de indivíduos sadios e pacientes com PCM ativa ou tratada.

Como mostrado na Figura 21A, os linfócitos estimulados com PHA de todos os grupos estudados secretaram mais TNF- α que os não-estimulados (Li+Meio).

Quando DCs do grupo PT previamente tratadas com TNF- α e estimuladas com CFA foram co-cultivadas com linfócitos autólogos (Li+DC+TNF+CFA), foi observado significativamente mais TNF- α que nas culturas de estimuladas com gp43 a 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ (Li+DC+TNF+Gp2 e Li+DC+TNF+Gp5; $p < 0,01$ em ambas) ou na ausência de antígenos (Li+DC+TNF; $p < 0,001$) (Figura 21B).

Na comparação entre os diferentes tratamentos dispensados às DCs de pacientes com PCM ativa (PA), observou-se que nos co-cultivos de linfócitos autólogos e DCs estimuladas com CFA (Li+nDC+CFA ou Li+DC+TNF+CFA), as células apresentaram maiores níveis de TNF- α que as culturas-controle (Li+nDC; $p < 0,05$ ou Li+DC+TNF; $p < 0,01$).

Figura 21: Níveis da citocina TNF- α em sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células dendríticas.

A. Culturas de controle: células dendríticas não-tratadas em meio de cultura (nDC+Meio), linfócitos autólogos (Li) em meio de cultura (Li+Meio) e linfócitos autólogos estimulados com fitohemaglutinina (Li+PHA); diferenças estatisticamente significantes $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ em relação a Li+Meio; **B.** DCs não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA) de 13 indivíduos saudáveis (CO), 18 pacientes com PCM ativa (PA) e 19 pacientes com a doença tratada (PT), após 144 horas de cultura. Resultados representados como média com SEM dos níveis em pg/mL; diferenças estatisticamente significantes indicadas pelas chaves $**p < 0,01$; ou $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ ou $***p < 0,001$ em relação às DCs sem antígeno (Li+nDC ou Li+DC+TNF); ND = níveis não-detectados.

Tabela 6. Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os níveis de proliferação e de citocinas em culturas de linfócitos ou co-cultivos de células dendríticas não-tratadas (nDC) e tratadas com TNF- α (DC+TNF), estimuladas com gp43 a 2 $\mu\text{g/mL}$ (Gp2) e a 5 $\mu\text{g/mL}$ (Gp5), e CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ (CFA), por grupos de pacientes com PCM ativa (PA) e PCM tratada (PT), co-cultivadas com linfócitos autólogos (Li)

Variável	Grupo	Cultura		Valor de <i>p</i>
		1	2*	
Proliferação	CO	Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+nDC	Li+nDC+CFA	<0,01
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,001
		Li+DC+TNF+Gp5	Li+DC+TNF+CFA	<0,05
	PT	Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,05
IL-10	CO	Li+Meio	Li+PHA	<0,01
	PA	Li+Meio	Li+PHA	<0,001
	PT	Li+Meio	Li+PHA	<0,001
IFN- γ	CO	Li+Meio	Li+PHA	<0,01
		Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+nDC	Li+nDC+CFA	<0,05
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,01
	PT	Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+nDC	Li+nDC+CFA	<0,01
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,001
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,001
TNF- α	CO	Li+Meio	Li+PHA	<0,05
		Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+nDC	Li+nDC+CFA	<0,05
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,01
	PT	Li+Meio	Li+PHA	<0,001
		Li+DC+TNF	Li+DC+TNF+CFA	<0,001
		Li+DC+TNF+Gp2	Li+DC+TNF+CFA	<0,01
		Li+DC+TNF+Gp5	Li+DC+TNF+CFA	<0,01

*média com SEM de maior valor

Tabela 7. Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os grupos de indivíduos sadios (CO), de pacientes com PCM ativa (PA) e de pacientes com PCM tratada (PT), no co-cultivo de células dendríticas previamente tratadas com TNF- α e estimuladas com CFA a 15 $\mu\text{g/mL}$ e linfócitos autólogos (Li+DC+TNF+CFA)

Variável	Estímulo	Grupo		Valor de <i>p</i>
		1	2*	
Proliferação	Li+DC+TNF+CFA	CO	PA	<0,01
IL-10	Li+DC+TNF+CFA	CO	PA	<0,05
IL-4	Li+DC+TNF+CFA	CO	PT	<0,05
IFN- γ	Li+DC+TNF+CFA	CO	PT	<0,05

*média com SEM de maior valor

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

5. DISCUSSÃO

As células dendríticas (DCs) são consideradas apresentadoras de antígenos “profissionais”, estabelecendo uma relação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. Essas células ganharam maior destaque nos estudos a partir da década de 90, quando se desenvolveram meios de diferenciá-las a partir de monócitos do sangue periférico (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Romani et al., 1994; Thurner et al., 1999).

Grandes avanços têm sido alcançados no conhecimento da interação hospedeiro-parasito na paracoccidioidomicose, porém vários mecanismos que envolvem o destino da infecção e sua evolução para doença em suas diferentes apresentações clínicas em humanos não são conhecidos (Oliveira et al., 2002; Ferreira et al., 2007; Loures et al., 2015a). Adicionalmente, estudos têm procurado novos meios de modular a resposta imune celular para conferir maior resistência ao hospedeiro em várias micoses (Gafa et al., 2007; Pietrella et al., 2008; Nesbit et al., 2010). As células dendríticas, por serem excelentes apresentadoras de antígenos, poderiam ser manipuladas na tentativa de modular a resposta celular adaptativa contra uma fração antigênica específica, através do estímulo de linfócitos com perfil Th1 de citocinas. Neste contexto, o presente trabalho pesquisou o papel das células dendríticas na paracoccidioidomicose humana, bem como sua função na resposta imune adaptativa efetora.

Inicialmente, realizou-se a padronização da diferenciação e ativação das DCs. Como mostrado nos resultados deste trabalho, foi possível obter células dendríticas, a partir de monócitos de pacientes com PCM, com características próprias dessas células confirmadas por citometria de fluxo, através da expressão das moléculas de superfície

marcadas com anticorpos específicos. Além disso, o protocolo de ativação com TNF- α recombinante para a maturação dessas células foi também eficiente, resultando em células maduras, com alta expressão de moléculas co-estimulatórias (CD86 e CD80) e MHC-classe II (HLA-DR).

Considerando-se que a apresentação de frações antigênicas é realizada pelo contato entre moléculas de superfície de células dendríticas e linfócitos T, foram analisados os efeitos de antígenos de *P. brasiliensis* na expressão dessas moléculas. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que, nas concentrações utilizadas para estimular as DCs, tais antígenos não foram capazes de modificar de maneira significativa a expressão das moléculas estudadas, porém, observou-se que as células de pacientes com PCM tratada (grupo PT) apresentaram relativamente maior expressão das moléculas HLA-DR e CD86 em relação aos indivíduos saudáveis (Figuras 8 e 9). As moléculas HLA-DR e CD86 são conhecidamente partes do mecanismo de apresentação antigênica. A molécula CD11c, no entanto, é pouco relacionada a essa função apesar de ser essencial na proliferação de linfócitos T mediada por células de Langerhans (Meunier et al., 1994) e apesar de uma proporção um pouco mais elevada em pacientes tratados frente ao estímulo com Gp2, esta diferença não foi significativa estatisticamente.

Anteriormente, Ferreira et al. (2004) relacionaram o estímulo de gp43 (10 μ g/mL) à baixa expressão das moléculas de MHC-II e CD86, e à baixa secreção de IL-12 e TNF- α por células dendríticas de camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Nossos resultados com células de pacientes com PCM ativa estimuladas com gp43 mostraram baixa expressão principalmente de HLA-DR combinada à baixa secreção de IL-12p40, sugerindo similar efeito inibitório da glicoproteína também sobre as DCs humanas (Figuras 8 e 13). Comparativamente, as células de pacientes com PCM tratada

apresentaram alta expressão das moléculas e secretaram altos níveis de IL-12p40 quando estimuladas com gp43, sugerindo que tais células não estejam sob influência dos efeitos inibitórios desta glicoproteína, nas concentrações utilizadas.

Benard et al. (2001) relacionaram a secreção de IL-10 ocasionada pela gp43 (20 µg/mL) às células aderentes, monócitos e macrófagos, e não aos linfócitos, resultando na hiporresponsividade dessas células. Similarmente, os níveis de IL-10 nas culturas de DCs isoladas foram até quatro vezes maiores que os observados nos co-cultivos de DCs e linfócitos, indicando que a secreção desta citocina possa estar diretamente relacionada ao processamento da gp43–nas células apresentadoras de antígenos, mesmo em baixas concentrações (Figuras 12 e 18). Além disso, a ausência de diferenças entre os níveis de IL-10 secretada pelas PBMCs de pacientes com PCM ativa ou tratada, frente à glicoproteína (1 µg/mL), foi também observada por Sadahiro et al. (2007b).

Estudos experimentais recentes demonstraram que os principais efeitos da IL-10 ocorrem no início da infecção. Camundongos IL-10-deficientes apresentaram macrófagos com maior atividade fungicida e fagocítica, associadas à maior produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico, em relação aos animais selvagens-controles, logo após a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*. Tardamente, foi observado que os animais sem IL-10 também tinham resposta imune humoral precoce e controle de danos teciduais, resultando em maior taxa de sobrevivência (Costa et al., 2013). Na PCM humana ativa, a expressão de mRNA de IL-10 em PBMCs de pacientes com as formas crônica e aguda já é aumentada logo nas primeiras 3 horas pós-estímulo inespecífico, quando comparadas às células de indivíduos-controle e de indivíduos infectados sem a doença (Castro et al., 2013). Aparentemente, o efeito modulatório da IL-10 pode ser crucial para o desenvolvimento da PCM, controlando o número de células que sofrem apoptose

durante a doença (Cacere et al., 2002), e persistindo mesmo após a cura clínica, em função de um equilíbrio estabelecido entre esta citocina e citocinas pró-inflamatórias.

Ao lado de altos níveis de IL-12p40 em todas as culturas de DCs (Figura 13), não houve níveis detectáveis de IL-12p70. Não se pode descartar a possibilidade de termos dosado tanto IL-12 quanto IL-23, uma vez que a subunidade p40 é comum às duas citocinas.

Chamilos et al. (2010) demonstraram que a produção de IL-23 por DCs é dependente da ativação de um receptor de lectina tipo C, a dectina-1, pela β -glucana presente na parede celular dos fungos. No entanto, observou-se também que apenas fungos oportunistas (*Aspergillus* e *Rhizopus*) expõem esse polissacarídeo constantemente, induzindo a produção de IL-23 por DCs e a consequente resposta Th17. Os fungos patogênicos primários (*Histoplasma*), por sua vez, não apresentam β -glucana na forma invasiva leveduriforme, não estimulando, portanto, a secreção de IL-23 nem esse tipo de resposta de células T. Sendo *P. brasiliensis* também um fungo patogênico primário que induz respostas imunes semelhantes às de *Histoplasma*, é muito mais provável que a resposta observada seja definida pela IL-12.

Interessantemente, as células dendríticas tratadas com TNF- α de pacientes com PCM tratada secretaram doses mais elevadas de IL-12p40 frente a todos os estímulos, comparativamente às células na doença ativa. Tal resultado pode ser relacionado ao trabalho de Livonesi et al. (2008), que associaram a subunidade p40 da citocina IL-12 à resistência na PCM experimental. Esses autores registraram 100 % de mortalidade (30º. dia) em camundongos p40 deficientes infectados por *P. brasiliensis*, com presença de granulomas mal-formados e grande quantidade de leveduras. Sugere-se que a deficiência observada na produção de IL-12p40 na fase ativa da doença humana possa ser transitória, atingindo níveis próximos ou mesmo maiores que os observados em

células de indivíduos sadios, após a cura clínica. Adicionalmente, essa deficiência seria antígeno-específica, similarmente ao sugerido por Benard et al. (1996 e 1997) com relação à resposta linfoproliferativa. Embora em níveis proporcionalmente inferiores aos observados com as células tratadas com TNF- α , as DCs do grupo PT não-tratadas com essa citocina secretaram mais IL-12p40 na presença de gp43 e CFA (nDC+Gp2, nDC+Gp5 e nDC+CFA) do que na ausência de estímulo (nDC), indicando que mesmo na ausência de TNF- α , as células poderiam induzir a secreção de IFN- γ por linfócitos (Figura 20).

As concentrações da citocina IL-1 β , em nosso estudo, foram baixas em todos os estímulos utilizados nas culturas de DCs (Figura 14). Essa citocina é capaz de induzir a maturação dessas células e consequente aumento na secreção de IL-12 *in vitro* (Nakahara et al., 2005), e esse efeito só foi observado nas DCs tratadas com TNF- α e estimuladas com gp43 a 5 μ g/mL (DC+TNF+Gp5) dos grupos de pacientes com PCM ativa e de indivíduos-controle, que apresentaram as maiores médias de IL-1 β e IL-12p40 dentre os tratamentos testados. Por outro lado, esse mesmo tratamento também induziu maiores níveis de IL-10 (Figura 12), o que pode ter implicado na baixa proliferação dos linfócitos e níveis reduzidos de IFN- γ (Figuras 17 e 20, respectivamente).

Observou-se, no presente trabalho, que a secreção da quimiocina CCL18 foi também elevada em pacientes com PCM ativa e nos indivíduos sadios, mas reduzida na doença tratada, ainda que sem diferenças significantes, seja entre os grupos, seja entre os tratamentos utilizados (Figura 15). Segundo Vulcano et al. (2003), a CCL18 está relacionada à quimiotaxia de DCs e linfócitos T, sendo secretada abundantemente por DCs mielóides imaturas, induzida por IL-10, e inibida durante a maturação por TNF- α ou *Candida albicans*. Sendo a secreção dessa quimiocina pelas DCs diretamente

relacionada a indução por IL-10, a ausência de diferenças entre os níveis da primeira pode ser explicada pela mesma ausência observada nas dosagens da segunda. A CCL18 pode induzir a geração de DCs com perfil tolerogênico (Azzaoui et al., 2011), atraindo preferencialmente células T regulatórias secretoras de IL-10 para os pulmões (Chenivesse et al., 2012). Considerando ainda que a CCL18 é produzida em altas concentrações por APCs nos linfonodos e pulmões, órgãos comumente acometidos na PCM, seu papel nessa micose merece investigações futuras mais aprofundadas.

Foi analisado, juntamente com a gp43, o efeito de outro antígeno de *P. brasiliensis*, o CFA (“Cell-Free Antigen”), que é um preparado antigênico secretado por leveduras da cepa B-339 desse fungo, constituído por glicoproteínas de variados pesos moleculares, que incluem a gp43 (Camargo et al., 1991). Similarmente a essa glicoproteína, o estímulo com CFA também não exerceu efeitos notáveis na expressão das moléculas de superfície das DCs. No entanto, nas DCs estimuladas com CFA, tratadas ou não com TNF- α (nDC+CFA e DC+TNF+CFA), houve alta produção de IL-12p40, especialmente pelas células de pacientes com PCM tratada (Figura 13). Os níveis de IL-10, IL-1 β e CCL18 secretados pelas DCs não foram alterados frente a esse estímulo quando comparados às culturas-controle (Figuras 12, 14 e 15, respectivamente).

A indução *in vitro* da secreção de maiores níveis de IL-12 causada por IL-1 β em DCs, descrita por Nakahara et al. (2005) e discutida nessa seção com relação ao estímulo de gp43 a 5 μ g/mL com TNF- α , não foi observada com o tratamento de CFA, também na presença de com TNF- α . As DCs de pacientes PCM tratada, sob o efeito desse antígeno, não só exibiram a menor média de IL-1 β , como também apresentaram a maior média de IL-12p40, em relação aos demais tratamentos, ainda que sem diferença significativa. É possível que nessas culturas, a IL-1 β tenha sido produzida em maiores

níveis e prontamente consumida, sendo pouco detectada após o período de 48 horas padronizado em nossos experimentos, mas traduzindo-se nos maiores níveis de IL-12p40.

Estudos mais aprofundados acerca da IL-1 β em DCs na PCM humana devem ser conduzidos para melhor esclarecer os resultados obtidos nesse trabalho e possivelmente verificar os efeitos de *P. brasiliensis* sobre as vias de sinalização do inflamossoma NLRP3, um complexo proteico citoplasmático responsável pelo controle da produção dessa citocina, que se mostrou um importante mecanismo de proteção na doença experimental (Tavares et al., 2013).

Com relação à resposta proliferativa de linfócitos frente às DCs estimuladas com CFA, observou-se esse antígeno é processado e apresentado pelas células dendríticas, resultando nos maiores valores observados de incorporação de timidina triciada (Figura 17), especialmente em co-cultivos de células de pacientes com PCM ativa, em relação ao grupo CO e às culturas com DCs não-estimuladas, tratadas ou não com TNF- α (Li+nDC e Li+DC+TNF). Níveis semelhantes de linfoproliferação foram também observados nos co-cultivos de células de pacientes com PCM tratada. As culturas de indivíduos sadios não apresentaram proliferação frente às DCs estimuladas com os antígenos, indicando que a resposta proliferativa possa ser específica.

A secreção de IL-10 observada nos sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos e DCs estimuladas com CFA revelou que as células de pacientes com PCM tratada parecem ser mais capazes de responder de modo constante ao manter quantidades menores ou similares dessa citocina, em relação às culturas sem o antígeno e às do grupo controle, e menores que as do grupo com PCM ativa (Figura 18). Esse mesmo fenômeno foi observado nos níveis de IL-10 na cultura de DCs de pacientes do grupo PT na presença de CFA (Figura 12). Nas células de pacientes com PCM ativa sob o

mesmo estímulo, os níveis foram maiores no co-cultivo em relação aos demais grupos, e semelhantes aos do grupo controle nas culturas de DCs isoladas. Em contraste com o estímulo de gp43 a 5 µg/mL, que induziu aumento nos níveis de IL-10 nas DCs dos grupos CO e PT, o CFA parece ter pouco efeito sobre as células do grupo de pacientes tratado e parece causar redução na secreção dessa citocina pelas células em co-cultivo do grupo CO, em comparação às culturas não-estimuladas e, especialmente, às do grupo PA.

Nos co-cultivos de linfócitos e DCs estimuladas com CFA (Li+nDC+CFA e Li+DC+TNF+CFA) de pacientes com PCM tratada, os níveis de IL-4 observados foram cerca de 107 pg/mL, semelhantes aos de TNF- α , enquanto que na doença ativa foram cerca de 74 pg/mL (Figura 19 e 21). No entanto, a produção de IFN- γ nas mesmas condições foi extremamente elevada, tanto em pacientes com PCM tratada como na doença ativa (Figura 20). Sugere-se que o efeito do IFN- γ deva ser proporcional à sua alta concentração, em paralelo aos níveis proporcionalmente menores de IL-4, tanto na doença ativa como na tratada. Kashino et al. (2000) descreveram resultados semelhantes em camundongos resistentes, nos quais o CFA foi associado à alta linfoproliferação em culturas de polimorfonucleares de sangue periférico e altos níveis de IFN- γ na fase inicial da infecção, altos níveis de IL-4 e IL-5 na fase mais tardia e níveis intermediários e constantes de IL-10. Discutiu-se então que o IFN- γ secretado na fase inicial seria responsável pelo direcionamento das células para a resposta Th1, que não seria modificado posteriormente mesmo na presença de IL-4 e IL-5.

Os altos níveis de IL-10 e os intermediários de IL-4 nos co-cultivos de linfócitos e DCs de pacientes com PCM ativa, estimuladas com gp43 e com CFA, no presente trabalho, corroboram com os resultados obtidos previamente na doença experimental. Arruda et al. (2004), em investigação sobre o papel da IL-4, observaram que a ausência

ou a inativação dessa citocina não protege os camundongos susceptíveis (B10.A) na infecção por *P. brasiliensis*, mas reduz as lesões causadas pelo fungo em animais de susceptibilidade intermediária (C57BL/6), com concomitante aumento de IL-12 no fígado e TNF- α nos pulmões. Posteriormente, o mesmo grupo relacionou a ausência de IL-10 nesses animais à resposta imune favorável e melhor regressão da patogenia de *P. brasiliensis* (Costa et al., 2013). É possível, portanto, que na vigência da doença humana, a IL-10 em altas concentrações em colaboração da IL-4 também seja uma das principais responsáveis pela anergia da resposta imune celular protetora.

Paralelamente, neste trabalho, foi observado que as DCs estimuladas com CFA induziram a secreção de altos níveis de IFN- γ e TNF- α pelas células de pacientes com PCM ativa e tratada, resultando nas maiores taxas de linfoproliferação dentre os co-cultivos estudados, corroborando com resultados obtidos por Richards et al. (2002), na coccidioidomicose. O estímulo da gp43 nas DCs, por sua vez, não foi igualmente eficiente na indução da secreção dessas citocinas ou da linfoproliferação.

Os diferentes efeitos do CFA e da gp43 observados nos co-cultivos de DCs e linfócitos podem ser devido às suas diferentes conformações. Diferentemente dos resultados de Mendes-Giannini et al. (1990), com reconhecimento da gp43 pela IgM, Blotta & Camargo (1993) observaram que apenas a IgG se ligou a esta glicoproteína quando soros de pacientes com paracoccidioidomicose foram incubados com CFA. Discutiu-se então que o processo de glicosilação das moléculas da gp43 seja diferente no preparo do CFA, devido aos diferentes meio de cultura e a cepa utilizados, resultando em epítomos de carboidratos inacessíveis para IgM. Além disso, o CFA contém a glicoproteína de 70kDa, que inibe as funções *in vitro* de macrófagos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (Grosso et al., 2003), e a de 75kDa que é

imunogênica e contém sequência de aminoácidos homóloga (87%) a outros fungos como *Aspergillus fumigatus* e *Coccidioides immitis* (Xander et al., 2007).

Nossos resultados sugerem que a gp43 purificada deva ser processada pelas células dendríticas, porém, que os epítomos apresentados não sejam adequados para modular a resposta imune celular. Por outro lado, a gp43, quando presente em um preparado antigênico mais bruto, aumentou a reação de hipersensibilidade tardia em cobaias-infectados com *P. brasiliensis* (Rodrigues & Travassos, 1994). Dessa forma, o CFA contém a gp43 e outras glicoproteínas que, isoladamente, podem suprimir a resposta de linfócitos e macrófagos, porém, quando combinadas nesse preparado antigênico, devem ser metabolizadas e apresentadas de maneira diferente, resultando no aumento da secreção de IFN- γ e TNF- α e numa resposta celular aumentada nos pacientes.

É possível que a presença da gp43 no CFA seja crucial para os efeitos observados em nosso estudo. Cavassani et al. (2011) prepararam o CFA segundo Jimenez-Finkel & Murphy (1988), a partir da cepa *P. brasiliensis* Pb18 que é altamente virulenta, mas de com baixa produção de gp43. Após duas semanas da inoculação desse antígeno em camundongos, foi feita a infecção com leveduras de *P. brasiliensis*. Foram observadas lesões granulomatosas desorganizadas, altas cargas fúngicas nos pulmões, fígado e baço, e altos níveis de IL-4, relacionando, dessa maneira, o CFA ao aumento da gravidade na PCM. Quando este CFA foi fracionado por eletroforese em gel de poliacrilamida, a gp43 não foi observada. No presente trabalho, a cepa B-339 foi utilizada para o preparo do CFA, confirmando-se a presença desta glicoproteína também por eletroforese, similarmente ao descrito por Camargo et al. (1991).

A apresentação e os efeitos diferenciados de antígenos pelas DCs ficaram ainda mais evidentes na comparação entre as respostas proliferativas em ensaios com PBMCs

(Figura 5) e com linfócitos autólogos (Figura 17), frente à gp43 e ao CFA. Notou-se que a gp43 induziu alta proliferação apenas nas PBMCs de pacientes com PCM tratada como descrito anteriormente (Benard et al., 1997), enquanto que as DCs com essa glicoproteína induziram baixa proliferação de linfócitos tanto de pacientes quanto de indivíduos-controle. O CFA, por outro lado, induziu linfoproliferação nos ensaios com PBMCs de todos os grupos, porém apenas as células do grupo de pacientes com PCM tratada, e não com doença ativa, proliferaram significativamente mais que as do grupo controle. No co-cultivo de linfócitos autólogos e DCs previamente estimuladas com CFA, houve proliferação significativa das células dos dois grupos de pacientes, mas não do grupo controle.

No presente trabalho, os pacientes com PCM foram estudados e divididos em dois grupos segundo a doença, ativa ou tratada, como descrito em Materiais, Métodos e Casuística. Na análise segundo as formas clínicas, crônica e aguda, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre esses grupos (dados não mostrados). Por outro lado, o número de pacientes com a forma aguda da PCM, seja ativa ou tratada, foi muito menor que os incluídos com a forma crônica, devendo-se à menor ocorrência de casos com a forma aguda que com a forma crônica (Barrozo et al., 2010). Futuros estudos com um número maior de pacientes com PCM aguda possibilitaria uma discussão mais aprofundada sobre a possível influência das DCs na definição da evolução clínica mais grave dessa doença.

Outro fator que possivelmente também influencia os resultados observados em DCs na PCM é o regime terapêutico utilizado. A inclusão de pacientes foi realizada segundo critérios clínicos já citados no parágrafo anterior, e face à redução da demanda que tem sido observada, foram analisados todos os pacientes, independente da terapêutica utilizada. Tendo sido esta bastante heterogênea, com uso ou não de

anfotericina na fase de indução e itraconazol ou cotrimoxazol na fase de doença ativa e/ou de manutenção, um grande número de subgrupos com poucos pacientes seria necessário para tal análise, que não foi realizada. Dessa forma, para melhor compreender a ação de drogas antifúngicas e outras terapêuticas associadas, novos experimentos devem ser conduzidos, controlando-se o tipo e a dose de medicamentos administrados, o tempo de terapêutica e a ação dos medicamentos sobre as diversas expressões da resposta imune, como já descrito por Parise-Fortes et al. (2006), em monócitos na PCM humana, e por Sanderson et al. (2007), em DCs de indivíduos sadios e camundongos.

Além do tratamento convencional com drogas antifúngicas, o interesse por alternativas terapêuticas tem aumentado muito nos últimos anos, buscando diminuir a toxicidade medicamentosa e desenvolver respostas imunes mais eficientes e protetoras no hospedeiro. Nesse contexto, avanços importantes foram obtidos com o uso de DCs como vacina profilática e terapêutica na PCM experimental. Magalhães et al. (2012) imunizaram camundongos com o peptídeo P10 de gp43, já descrito como um indutor de resposta imune protetora nessa micose (Taborda et al., 1998), e co-cultivaram DCs previamente estimuladas com esse peptídeo e esplenócitos desses animais, verificando aumento da proliferação in vitro de células T em relação ao estímulo de P10 isolado. Além disso, os autores também injetaram essas DCs estimuladas com P10 antes e semanas após a infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*, observando respostas protetoras nas duas situações.

A utilização de DCs transfectadas com um plasmídeo codificador de um fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo anti-idiotípico que “imita” a gp43 também foi avaliada em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Essas células foram capazes de induzir uma resposta protetora nesses animais, com

diminuição da infecção pulmonar e ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos (Ferreira et al., 2011; Jannuzzi et al., 2015).

Além desses estudos na PCM, muitos outros foram realizados em outras doenças, infecciosas ou não, e o uso *in vivo* dessas células como terapia foi realizado em um número muito reduzido de pacientes em alguns tipos de câncer, em situações de resistência à quimioterapia (revisado por Kastenmüller et al., 2014) e em algumas infecções virais causadas por HIV-1 (García et al., 2013) e HPV (Ramanathan et al., 2014). Esses estudos mostraram resultados, em sua maioria, promissores e, ao mesmo tempo, levantaram questionamentos relevantes como segurança e efeitos adversos nos pacientes, número de células necessárias para diferenciação e para re-inoculação, e principalmente, adequação da dose e natureza do antígeno para estimular DCs na indução de uma resposta imune ativa, eficaz e limitada à doença.

Na PCM, além das dificuldades mencionadas, algumas perguntas ainda precisam ser respondidas para possibilitar o uso de DCs na imunoterapia em humanos, e talvez a principal delas seja a interação do fungo e seus antígenos com essas células e as diversas respostas imunes resultantes.

Ferreira et al. (2007), estudando camundongos susceptíveis infectados com *P. brasiliensis*, estabeleceram relação entre as células dendríticas produtoras de IL10 e susceptibilidade na paracoccidiodomicose. Tais células eram ativadas via receptor Toll-like-2 (TLR-2) e dectina-1. Mais recentemente, Loures et al. (2009 e 2015a) observaram que a deficiência de TLR-2 em camundongos infectados com *P. brasiliensis* resulta no aumento das citocinas do perfil Th17 (IL-6, IL-23, TGF- β e IL-17), que induzem reações inflamatórias exacerbadas e aumento da destruição tecidual nos pulmões. Além disso, há um sinergismo entre TLR-4, dectina-1 e receptor de manose no contato entre DCs e *P. brasiliensis*, induzindo as respostas Th17 em células T CD4⁺ e Tc17 nas

CD8+. Dessa maneira, percebe-se que o fungo pode ativar diferentes receptores da resposta imune inata, resultando em diferentes desfechos na doença.

Como demonstrado no presente trabalho, as diferentes frações antigênicas de *P. brasiliensis* também modularam as DCs e induziram respostas imunes diversas nas células dos pacientes com PCM. Adicionalmente, registrou-se a capacidade de células dendríticas de pacientes com paracoccidioidomicose de modular e assim, reverter a imunodepressão celular in vitro característica dessa doença. Abrem-se, pois, perspectivas para o emprego dessas células como ferramentas para a escolha de antígenos fúngicos adequados, com análise das respostas imunes subsequentes e seu emprego na imunoterapia anti- *P. brasiliensis* na doença humana.

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

6. CONCLUSÕES

- Pacientes com paracoccidioidomicose tratada tem alta expressão das moléculas CD11c, HLA-DR e CD86 em suas células dendríticas, e pacientes com a doença ativa tem expressão dessas moléculas de superfície, em suas células dendríticas, similar às de indivíduos saudáveis.
- Observou-se diferença entre os estímulos de gp43 e CFA de *P. brasiliensis* para a secreção de citocinas. A gp43 induziu a secreção de altos níveis de IL-12p40 e IL-10 em células dendríticas de pacientes tratados enquanto o CFA induziu níveis elevados de IL-12p40 e baixos de IL-10.
- A gp43, apesar de induzir altos níveis de IL-12p40 nas células dendríticas, induziu pouca linfoproliferação e baixos níveis de IFN- γ e TNF- α nos sobrenadantes de co-cultivo de linfócitos autólogos e células de pacientes com paracoccidioidomicose tratada, e de pacientes com a doença ativa.
- O CFA foi mais eficiente que a gp43 no estímulo de células dendríticas ao induzir proliferação de linfócitos autólogos, tanto de pacientes com paracoccidioidomicose tratada quanto de pacientes com a doença ativa, sem induzir proliferação nos indivíduos saudáveis.
- Além de reverter a baixa linfoproliferação de pacientes com paracoccidioidomicose ativa, o estímulo de CFA em células dendríticas também levou ao aumento da secreção de IFN- γ e TNF- α no co-cultivo com linfócitos

autólogos. Esses resultados, combinados aos níveis constantes de IL-10 e altas concentrações de IL-12p40, sugerem que o CFA é melhor indutor de resposta Th1, podendo servir como alvo para pesquisas de epítomos candidatos à vacina de células dendríticas anti-*P. brasiliensis*.

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 1997; 387:713–717.
- Almeida SR, Moraes JZ, Camargo ZP, Gesztes J, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol*. 1998; 190:68–76.
- Almeida SR, Lopes JD. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34:529–537.
- Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, Kashino SS, Fazioli RA, Vaz CA, Franco MF, Keller AC, Calich VL. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun*. 2004; 72(7):3932–3940.
- Azzaoui I, Yahia SA, Chang Y, Vorng H, Morales O, Fan Y, et al. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood*. 2011; 118:3549–3558.
- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998; 392:565–568.
- Baida H, Biselli P, Juvenale M, Del Negro G, Mendes-Gianini MJS, Duarte A, Benard G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 1999; 1:273–278.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392:245–252.
- Barrozo LV, Benard G, Silva MES, 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; 4:e643.
- Benard G, Hong M, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54:7–12.
- Benard G, Mendes-Giannini MJS, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJS. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis*. 1997; 175:1263–1267.
- Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001; 13:248–252.

- Blotta MHSL, Camargo ZP. Immunological response to Cell-Free Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:671-676.
- Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol.* 2013; 8(9):1177-1191. Erratum in: *Future Microbiol.* 2013; 8(12):1636.
- Bozza A, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, Di Francesco P, Romani L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol.* 2002; 168:1362-1371.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein resins the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-259.
- Bruna-Romero O, Schmiege J, Del Val M, Buschle M, Tsuji M. The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC Chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria. *J Immunol.* 2003; 170:3195-3203.
- Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1985; 23:407-414.
- Cacere CR, Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol.* 2002; 105:215-222.
- Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31:615-623.
- Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:2147-2151.
- Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol.* 1991; 29:31-38.
- Cambi A, Gijzen K, de Vries IJ, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor CG. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003; 33(2):532-538.
- Castro LF, Ferreira MC, Silva RM, Blotta MHSL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013; 67:470-485.
- Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, Martinez R, Silva JS. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol.* 2006; 177:5811-5818.
- Cavassani KA, Tristao FS, Oliveira LL, Rocha FA, Vancim JO, Moreira AP, Campanelli AP, Panagio LA, Milanezi CM, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Cell-free

- antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* drive IL-4 production and increase the severity of paracoccidioidomycosis. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21423.
- Chamilos G, Ganguly D, Lande R, Gregorio J, Meller S, Goldman WE, Gilliet M, Kontoyiannis DP. Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of Th-17 responses. *PLoS One*. 2010; 5(9):e12955.
- Chenivresse C, Chang Y, Azzaoui I, Ait Yahia S, Morales O, Plé C, Foussat A, Tonnel AB, Delhem N, Yssel H, Vorng H, Wallaert B, Tsicopoulos A. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells. *J Immunol*. 2012; 189:128-137.
- Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MIN, Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem*. 1996; 271:4553-4560.
- Costa TA, Bazan SB, Feriotti C, Araújo EF, Bassi EJ, Loures FV, Calich VLG. In pulmonary paracoccidioidomycosis IL-10 deficiency leads to increased immunity and regressive infection without enhancing tissue pathology. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10):e2512.
- Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR, Coimbra CE Jr. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Trop Med Int Health*. 2015; 20(5):673-680.
- D'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med*. 2000; 191:1661-1673.
- Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett*. 2004; 94:107-114.
- Ferreira KS, Almeida SR. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce as increase of pulmonar paracoccidioidomycosis. *Immunol Lett*. 2006; 103:121-126.
- Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cell induces interleukin-10 production and Toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis*. 2007; 196:1108-1115.
- Ferreira KS, Maranhão AQ, Garcia MC, Brígido MM, Santos SS, Lopes JD, Almeida SR. Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp43 induces protection against experimental Paracoccidioidomycosis. *PLoS One*. 2011; 6(1):e15935.
- Franco MF, Lacaz LC, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. ed. Paracoccidioidomycosis, Boca Raton, Florida: *CRC Press*. 1994. ISBN: 0-8493-4868-4.
- Gafa V, Lande R, Gagliardi Mc, Severa M, Giacomini E, Remoli ME, Nisini R, Ramoni C, Di Francesco P, Aldebert D, Grillot R, Coccia EM. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun*. 2006; 74:1480-1489.

- Gafa V, Remoli ME, Giacomini E, Gagliardi MC, Lande R, Severa M, Grillot R, Coccia EM. *In vitro* infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. *Microbes Infect.* 2007; 9:971-980.
- Gajewski TF, Pinnas M, Wong T, Fitch FW. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol.* 1991; 146:1750-1758.
- García F, Climent N, Guardo AC, Gil C, León A, Autran B, Lifson JD, Martínez-Picado J, Dalmau J, Clotet B, Gatell JM, Plana M, Gallart T; DCV2/MANON07-ORVACS Study Group. A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication. *Sci Transl Med.* 2013; 5(166):166ra2.
- Geijtenbeek TBH, Torensma R, Van Vliet SJ, Duijnhoven GC, Adema GJ, Van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 2000; 100:575-585.
- Gimenez MF, Tausk F, Gimenez MM, Gigli I. Langerhans' cells in paracoccidioidomycosis. *Arch Dermatol.* 1987; 123:479-481.
- Godoy LC, Mariano M, Lopes JD. Immunity and hypersensitivity to gp43 antigen in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2003; 41:427-436.
- Grosso DM, Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun.* 2003; 71:6534-6542.
- Hieshima K, Imai T, Baba M, Shoudai K, Ishizuka K, Nakagawa T, Tsuruta J, Takeya M, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Opdenakker G, Van Damme J, Yoshie O, Nomiyama H. A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *J Immunol.* 1997; 159:1140-1149.
- Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukin 4 and 10 in an alpha beta T cell receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1992; 89:6065-6069.
- Jannuzzi GP, Tavares AH, Kaihama GH, de Almeida JR, de Almeida SR, Ferreira KS. scFv from antibody that mimics gp43 modulates the cellular and humoral immune responses during experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS One.* 2015; 10(6):e0129401.
- Jimenez-Finkel BE, Murphy JW. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Infect Immun.* 1988; 56(4):734-743.
- Juvenale M, Del Negro GM, Duarte AJ, Benard G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2001; 50:127-134.
- Kalmar EM, Alencar FE, Alves FP, Pang LW, Del Negro GM, Camargo ZP, Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian amazon using skin tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71:82-86.

- Karhawi AS, Colombo AL, Salomão R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol.* 2000; 38:225-229.
- Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20:89-97.
- Kastenmüller W, Kastenmüller K, Kurts C, Seder RA. Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(10):705-711.
- Konno AY, Maricato JT, Konno FT, Mariano M, Lopes JD. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and onflammatory response. *Microbes Infect.* 2009; 11:92-99.
- Konno FTC, Maricato J, Konno AYC, Guerreschi MG, Vivanco BC, Feitosa LS, Mariano M, Lopes JD. *Paracoccidioides brasiliensis* GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. *Microbes Infect.* 2012; 14:517-527.
- Laemmli UK. Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 1970; 227:680-685.
- Livonesi MC, Souto JT, Campanelli AP, Maffei CML, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. *Med Mycol.* 2008; 46:637-646.
- Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztes JL, De Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major lamini-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27:2309-2313.
- Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VLG. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2009; 183:1279-1290.
- Loures FV, Araújo EF, Feriotti C, Bazan SB, Calich VL. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Front Microbiol.* 2015; 6:261.
- Loures FV, Röhm M, Lee CK, Santos E, Wang JP, Specht CA, Calich VL, Urban CF, Levitz SM. Recognition of *Aspergillus fumigatus* hyphae by human plasmacytoid dendritic cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2015; 11(2):e1004643.
- Luster AD. Chemokines: chemotatic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med.* 1998; 12:436-445.
- Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(1):23-29.
- Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine.* 2005; 32(1):20-29.

- Marques AS, Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, AIDS and cancer. In: Franco M, Lacaz LC, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. ed. Paracoccidioidomycosis, Boca Raton, Florida: CRC Press. 1994; 393-405.
- Marques Da Silva SH, Queiroz-Telles F, Colombo AL, Blotta MHSL, Lopes JD, Camargo ZP. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:2419-2424.
- McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo AM. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25:165-175.
- Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AMS, Masuda A, Neto VA, Ferreira AW. Antibody response to the 43kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43:200-206.
- Meunier L, Bohjanen K, Voorhees JJ, Cooper KD. Retinoic Acid upregulates human Langerhans cell antigen presentation and surface expression HLA-DR and CD11c, a $\beta 2$ integrin critically involved in T-cell activation. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:775-779.
- Morton CO, Fliesser M, Dittrich M, Mueller T, Bauer R, Kneitz S, Hope W, Rogers TR, Einsele H, Loeffler J. Gene expression profiles of human dendritic cells interacting with *Aspergillus fumigatus* in a bilayer model of the alveolar epithelium/endothelium interface. *PLoS One.* 2014; 9(5):e98279.
- Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques SA, Dillon NL, Franco MF. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79:765-72.
- Musatti CC, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 1976; 24:365-378.
- Nakahara T, Urabe K, Fukugawa S, Uchi H, Inaba K, Furue M, Moroi Y. Engagement of human monocyte-derived dendritic cells into interleukin (IL)-12 producers by IL-1 β +interferon (IFN)- γ . *Clin Exp Immunol.* 2005; 139:476-482.
- Nesbit L, Johnson SM, Pappagianis D, Ampel NM. Polyfunctional T lymphocytes are in the peripheral blood of donors naturally immune to coccidioidomycosis and are not induced by dendritic cells. *Infect Immun.* 2010; 78(1):309-315.
- Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MHSL. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2003; 21:234-241.
- Ngaosuwankul P, Pongtanalert P, Engering A, Chaiyaroj SC. Differential gene expression profiles of human monocyte-derived antigen presenting cells in response to *Penicillium marneffe*: roles of DC-SIGN (CD209) in fungal cell uptake. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2008; 26(2-3):151-163.

- Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4:139-144.
- Pagliari C, Fernandes ER, Ferreira da Silva WL, Alves de Lima Silva A, Stegun FW, Duarte MI, Sotto MN. Revisiting Langerhans cells in paracoccidioidomycosis: expression of CD207/langerin in human cutaneous and mucosal lesions. *Microbes Infect.* 2011; 13(12-13):1012-1017.
- Pagliari C, Sotto MN. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. *Med Mycol.* 2002; 40(4):407-410.
- Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003; 25(2):107-112.
- Panagio LA, Tristao FS, Moreira AP, Pereira MS, Cavassani KA, Milanezi CM, Rossi MA, Silva JS. Role of interleukin (IL)-18 in experimental paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2008; 46(5):435-442.
- Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol.* 2006; 154(4):643-650.
- Pfeiffer C, Murray J, Madri J, Bottomly K. Selective activation of Th1- and Th2-like cells *in vivo*-response to human collagen IV. *Immunol Rev.* 1991; 123:65-84.
- Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun.* 2005; 73:820-827.
- Pietrella D, Bistoni G, Corbucci C, Perito S, Vecchiarelli A. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8:602-612.
- Pietrella D, Lupo P, Rachini A, Sandini S, Ciervo A, Perito S, Bistoni F, Vecchiarelli AA. *Candida albicans* mannoprotein deprived of its mannan moiety is efficiently taken up and processed by human dendritic cell and induces T-cell activation without stimulating proinflammatory cytokine production. *Infect Immun.* 2008; 76: 4359-4367.
- Pina A, de Araujo EF, Felonato M, Loures FV, Feriotti C, Bernardino S, Barbuto JA, Calich VL. Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells. *Infect Immun.* 2013; 81(4):1064-1077.
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycosis as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:513-521.
- Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1610-1615.
- Ramanathan P, Ganeshrajah S, Raghavan RK, Singh SS, Thangarajan R. Development and clinical evaluation of dendritic cell vaccines for HPV related cervical cancer--a feasibility study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(14):5909-5916.

- Richards JO, Ampel NM, Lake DF. Reversal of coccidioidal anergy *in vitro* by dendritic cells from patients with disseminated coccidioidomycosis. *J Immunol.* 2002; 169:2020-2025.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, De Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999; 283: 1183-1186.
- Rodrigues EG, Travassos LR. Nature of reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32:77-81.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994; 180: 83-93.
- Sadahiro A, Roque ACM, Shikanai-Yasuda MA. Generic human leukocyte class II (DRB1 and DQB1) alleles in patients with paracoccidioicomyosis. *Med Mycol.* 2007; 45:35-40.
- Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40:156-162.
- Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes-Gianini MJS. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microb.* 1998; 36:1723-1728.
- Sallusto FA, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1994; 179:1109-1118.
- Sanderson JP, Naisbitt DJ, Farrell J, Ashby CA, Tucker MJ, Rieder MJ, Pirmohamed M, Clarke SE, Park BK. Sulfamethoxazole and its metabolite nitroso sulfamethoxazole stimulate dendritic cell costimulatory signaling. *J Immunol.* 2007; 178(9):5533-5542.
- Santiago K, Bomfim GF, Criado PR, Almeida SR. Monocyte-derived dendritic cells from patients with dermatophytosis restrict the growth of *Trichophyton rubrum* and induce CD4-T cell activation. *PLoS One.* 2014; 9(11):e110879.
- Saraiva ECO, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34: 155-61.
- Serrano-Gómez D, Domínguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbí AL. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* 2004; 173(9):5635-5643.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:151-161.
- Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Rev Immunol.* 2007; 7:19-30.

- Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CML, Ferreira BR, Travassos LR, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . *Am J Pathol*. 2003; 163:583-590.
- Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 1998; 66:786-93.
- Tavares AH, Magalhães KG, Almeida RD, Correa R, Burgel PH, Bocca AL. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(12):e2595.
- Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009; 52(2):273-283.
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods*. 1999; 223:1-15.
- Torres I, Hernandez O, Tamoyo D, Muñoz JF, Leitão Jr NP, García AM, Restrepo A, Puccia R, McEwen JG. Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Plos One*. 2013; 8:e68434.
- Travassos LR. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco M, Lacaz LC, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. ed. *Paracoccidioidomycosis*, Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994; 67-86.
- Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. 1987; 236:551-557.
- Vicentini AP, Gesztesí JL, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun*. 1994; 62:1465-1469.
- Vulcano M, Struyf S, Scapini P, Cassatella M, Bernasconi S, Bonecchi R, Calleri A, Penna G, Adorini L, Luini W, Mantovani A, Van Damme J, Sozzani S. Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J Immunol*. 2003; 170:3843-3849.
- Xander P, Vigna AF, Feitosa LS, Pugliese L, Bailão AM, Soares CMA, Mortara RA, Mariano M, Lopes JD. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect*. 2007; 9:1484-1492.

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

4. RESULTADOS

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Paracoccidioidomicose humana: reconhecimento de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* por células dendríticas e linfócitos B de pacientes com diferentes formas clínicas

PESQUISADOR: Maria Aparecida Shikanai-Yasuda

CARGO/FUNÇÃO: professora titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 14500

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	X	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR	

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

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

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

- 1. justificativa e os objetivos da pesquisa:** A Paracoccidioidomicose é uma doença que ocorre no Brasil, sendo causada por um fungo. As pesquisas sobre esta doença têm avançado, porém ainda é preciso esclarecer quais os fatores que levam ao desenvolvimento desta doença. Por este motivo este trabalho tem por objetivo examinar em um laboratório especializado de pesquisa, como alguns componentes existentes no sangue dos pacientes estão funcionando e de que forma isto pode influenciar no desenvolvimento da doença. Os resultados deste trabalho poderão contribuir para um melhor entendimento, contribuindo na busca da prevenção e tratamento desta doença.
- 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Neste trabalho serão selecionados pacientes que serão examinados por um médico especialista em doenças infecciosas. Após a consulta médica serão coletados 100 mililitros (10 tubos) de sangue de cada paciente. Este material será imediatamente encaminhado ao Laboratório de Imunologia, onde será separado para os testes. Nestes testes, as células presentes no sangue serão avaliadas com relação à sua capacidade de reconhecer o fungo causador da doença e estimular o sistema imunológico.
- 3. desconfortos e riscos esperados:** O maior desconforto será no momento da coleta de sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde do participante. Para a coleta serão utilizados somente materiais esterilizados e descartáveis.
- 4. benefícios que poderão ser obtidos:** Participando deste estudo, o voluntário não obterá qualquer benefício adicional, mas estará contribuindo enormemente para o avanço da pesquisa e na busca de um melhor entendimento desta doença.
- 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** Não haverá procedimentos alternativos.

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

- 1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** O participante terá direito a esclarecer qualquer dúvida referente à sua participação neste estudo. Além disso, será notificado sobre qualquer nova informação relacionada a este trabalho, além de poder contatar qualquer membro da equipe deste projeto, cujo número de telefone é 3066-7047.
- 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:** A participação é voluntária, podendo o participante se retirar deste estudo a qualquer momento, se assim o desejar.
- 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:** A participação do voluntário neste trabalho será confidencial, sendo a identidade do participante mantida em sigilo. Os registros e resultados dos testes relacionados ao estudo serão

informados somente aos médicos do HCFMUSP, bem como a autoridades normativas nacionais ou internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos.

- 4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa:** Durante a pesquisa não haverá quaisquer procedimentos que possam provocar danos à saúde do participante. Contudo, para qualquer eventualidade que possa ocorrer durante o atendimento e a coleta de sangue dos participantes é assegurada a assistência pelos médicos do HCFMUSP envolvidos no projeto.
- 5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa:** Não haverá procedimentos que possam provocar danos à saúde do participante decorrente desta pesquisa. Contudo, para qualquer eventualidade durante o atendimento médico e a coleta de sangue do participante será assegurada a assistência médica.

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

Profa. Maria Aparecida Shikanai-Yasuda e Paula Keiko Sato – Laboratório de Investigação Médica em Imunologia (Local: Instituto de Medicina Tropical II – R. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470; CEP 05403-000- São Paulo). Telefone para contato: 3061-7047/7048.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)