BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células dendríticas pulmonares induz produção de IL-10 e expressão de TLR2: possíveis mecanismos de suscetibilidade

Karen Spadari Ferreira

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2007

18.894

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012962

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ferreira, Karen Spadari
F383i Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células dendríticas pulmonares induz produção de IL-10 e expressão de TLR2: possíveis mecanismos de suscetibilidade / Karen Spadari Ferreira. -- São Paulo, 2007.
113p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Micologia médica 2. Imunologia I. T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

616.969 CDD

Karen Spadari Ferreira

Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células dendríticas pulmonares induz produção de IL-10 e expressão de TLR2: possíveis mecanismos de suscetibilidade

Comissão julgadora
da
Tese par obtenção do grau de Doutor

_____
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador/presidente

_____
1° examinador

_____
2° examinador

_____
3° examinador

_____
4° examinador

São Paulo, 11 de junho de 2007.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de micologia do departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa (**FAPESP**) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**).

Dedicatória

Agradeço a minha família, que aceitaram todos, pacientemente, as inconveniências e separações associadas à minha preocupação com este trabalho que, sem o contínuo apoio e compreensão, não teria sido realizado.

*Obrigado **Pai** e **Penha** por todo apoio*
em mais uma conquista em minha vida

*Obrigado aos meus irmãos **Marcelus**,*
***Idineu** e **Fernanda** pela amizade e*
Carinho

*Obrigado ao meu querido avô **Fernando***
por todo incentivo e ajuda

*Obrigado **Mãe**, minha fortaleza ...*

Agradecimento especial

Gostaria particularmente de expressar especial agradecimento ao ***Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida****, pela oportunidade e confiança durante todos esses anos. Agradeço por suas sugestões, conselhos e orientação que foram indispensáveis para o meu amadurecimento profissional e para a realização deste trabalho.*

Agradecimentos

*Aos grandes amigos do laboratório de Micologia pelo apoio e incentivo constante para realização deste trabalho, que por dividirem momentos especiais não poderia deixar de agradecer a cada um: **Maria da Glória Teixeira de Sousa, Eliver Eid Bou Ghosn, Viviane Mazo Fávero Gimenes, Gisele Facholi Bonfim, Vanessa Rosa Noal e Karla Letícia Santiago.***

*A **Sônia Caramico Buratto**, por seu carinho e companheirismo durante todos esses anos.*

*Aos Professores **Momtchilo Russo** e **Karina Bastos***
pela colaboração no trabalho e por seus ensinamentos.

SUMÁRIO

Sumário

I.	**Abreviaturas**	1
II.	**Resumo**	4
III.	**Abstract**	5
IV.	**Introdução**	6
V.	**Objetivos**	24
VI.	**Materiais e métodos**	25
1.	Animais	25
2.	Fungo	25
3.	Antígeno	25
4.	Dosagem de proteínas	25
5.	Purificação de células dendríticas pulmonares	25
6.	Caracterização fenotípica de células dendríticas através de citometria de fluxo	26
7.	Preparação do inóculo	27
8.	Ensaio de fagocitose	27
9.	Coloração por Giemsa	27
10.	Ensaio de dosagem de citocinas	28
11.	Infecção intratraqueal	29
12.	Microscopia eletrônica	29
13.	Expressão de moléculas de superfície de células dendríticas pulmonares após interação *in vivo* com *Pb*	29

14. Ensaio de migração de células dendríticas após fagocitose de leveduras *de P. brasiliensis* 29

15. Ativação de linfócitos T por células dendríticas pulmonares após infecção pulmonar por *P. brasiliensis* 30

15.1 Imunização de camundongos para ensaio de linfoproliferação 30

15.2 Ensaio de proliferação celular 30

16. Quantificação de citocinas 31

17. Análise da expressão de RNAm de TLR 2, TLR 4, CCR7 e MyD88 de células dendríticas após infecção experimental pelo *P. brasiliensis* 31

17.1 Extração de RNA total 31

17.2 Quantificação de RNA total 31

17.3 Pureza do RNA total 32

17.4 Síntese da primeira fita de cDNA 32

17.5 RT-PCR semiquantitativo 32

18. Análise estatística 33

VII. Resultados 34

1. Caracterização fenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo 34

2. Ensaio de fagocitose 34

3. Ensaio de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos 36

A/J e B10.A na presença de manana ou laminarina
4. Análise da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas pulmonares por citometria de fluxo após cultura *in vitro* com *P. brasiliensis* 37
5. Secreção de citocinas por células dendríticas pulmonares após interação *in vitro* com *P. brasiliensis* 38
6. Microscopia eletrônica de células dendríticas pulmonares purificadas após infecção com *P. brasiliensis* 39
7. Expressão de RNAm de TLR2, TLR4 e MyD88 em células dendríticas pulmonares 40
8. Ensaio de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos deficientes em TLR 4 ou TLR 2 41
9. Quantificação de citocinas produzidas por células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR 4 43
10. Quantificação de citocinas produzidas por células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR 2 45
11. Caracterização fenotípica de células dendríticas pulmonares por citometria de fluxo após infecção com *P. brasiliensis* 47
12. Produção de citocinas por células dendríticas pulmonares após infecção intratraqueal com *P. brasiliensis* 48
13. Ativação de linfócitos T CD4+ por células dendríticas pulmonares 51
14. Migração de células dendríticas pulmonares após infecção com *P. brasiliensis* 52
15. Expressão de RNAm de CCR7 em células dendríticas pulmonares 55

VIII. Discussão 56

IX. Conclusões 63

X. Referências Bibliográficas 65

XI. Anexo 92

XII. Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno

BSA – Albumina de Bovina Sérica

B7.1 – CD80

B7.2 – CD86

CBB – *Coomassie Brilliant Blue*

CCR – receptor de quimiocina

CD – "Cluster of Differentiation"

cDNA – Fita complementar de DNA

CDp – Células Dendríticas pulmonares

CFA – Antígeno livre da parede do fungo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

ELISA – "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"

Fc – Fragmento constante da molécula de imunoglobulina

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

gp – Glicoproteína

HPGRT - Enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase

IF – Índice fagocítico

IFN-γ - Interferon-gama

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

i.t. – Intratraqueal

ITAM – Imunoreceptor de tirosina

kDa – kiloDalton

LPS – Lipopolissacarídeo

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos

MELISA – "Magnetic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIF – Média de Intensidade de Fluorescência

mm - milímetros

MyD88 – adaptador comum de sinalização

NF-κB – Fator Nuclear NF-κB

OPD – Orthophenylenediamine

PAMPs – padrão de moléculas associadas aos patógenos

PBS – Solução Salina de Fosfato Tamponada

P. brasiliensis – *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM – Paracoccidioidomicose

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PE – Ficoeritrina

PRRs – receptores padrão de partículas microbianas

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

ROS – espécies reativas de oxigênio

RT - Retrotranscriptase

SBF – Soro Fetal Bovino

SPF – "specific pathogens free"

PRRs – receptores padrão de reconhecimento de partículas microbianas

TCR – Receptor de Células T

TGF-β - Fator β de Crescimento

Th – Linfócito T auxiliar

TLR – "Toll Like Receptor"

TNF-α - Fator α de Necrose Tumoral

RESUMO

RESUMO

A resposta imune adaptativa do tipo Th1 é necessária para proteção contra *P. brasiliensis*. Sabendo que células dendrítica são APCs eficientes na ativação da resposta imune mediada por células, investigamos o potencial dessas células em iniciar a resposta imune inata em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) a PCM.

Inicialmente, observamos que células dendríticas pulmonares de camundongos B10.A são mais fagocíticas quando comparadas com células de camundongos A/J. Além disso, observamos que a fagocitose na presença de laminarina foi inibida somente em células dendríticas pulmonares de animais B10.A.

A produção de citocinas por células dendríticas pulmonares de camundongos A/J mostrou baixa concentração de IL-10, IL-12 e TNF-α. Ao contrário, células dendríticas pulmonares de camundongos B10.A produziram altas concentrações de TNF-α e IL-10, mas, a produção de IL-10 foi significativamente inibida na presença de laminarina. Nós também observamos que células dendríticas pulmonares de camundongos TLR-2KO foram deficientes na produção de IL-10. Além disso, a expressão gênica para TLR-2 aumentou após infecção em camundongos B10.A, mas não nos A/J. Posteriormente, observamos que a capacidade de células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis em induzir ativação de células T foi diminuída.

De acordo com nossos resultados, sugerimos que *P. brasiliensis* induz células dendríticas regulatórias em camundongos suscetíveis, os quais promovem a produção de IL-10, contribuindo para a suscetibilidade de camundongos B10.A contra a infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras chave: células dendríticas pulmonares, *Paracoccidioides brasiliensis*, receptores "Toll like", apresentação de antígeno, paracoccidioidomicose.

ABSTRACT

Abstract

An adaptive Th1-type immune response is required for protection against *P.brasiliensis.* Knowing that DC are the most effective APCs for inducing cell-mediated immune responses, it is thus important to investigate lung DC and their potential to initiate an immune response in mice susceptible and resistant to PCM.

Initially, we observed that lung DC from susceptible mice were more phagocytic than cells from resistant mice and we observed that phagocytosis in the presence of laminarin was inhibited only in DC from susceptible mice.

Cytokines produced by DC from resistant mice showed a low concentration of IL-10, IL-12 and TNF-α. In contrast, DC from susceptible mice produced a high concentration of TNF-α and IL-10, but IL-10 production was significantly inhibited in the presence of laminarin. We also observed that DC from TLR-2KO mice presented a defective production of IL-10. We found that the gene expression for TLR2 is increased after infection in B10.A, but not in A/J mice. Thus, the capacity of lung DC from susceptible mice in inducing T cell activation was decreased.

In conclusion, our data suggest that *P.brasiliensis* induces regulatory DC in susceptible mice, which promotes IL-10 production contributing to the susceptibility of B10.A mice against *P.brasiliensis* infection.

Key words: Lung dendritic cells, *Paracoccidioides brasiliensis*, "Toll Like" receptors, antigen-presenting cells, paracoccidioidomycosis.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica e granulomatosa, que compromete primariamente e preferencialmente o tecido pulmonar, podendo através das vias linfática e hematogênica, atingir o tecido mucocutâneo e, por contiguidade, qualquer outro órgão.

A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Lutz, em paciente apresentando lesões na mucosa oral. Em 1912, outro pesquisador, Splendore consegue isolar o fungo causador da doença descrita por Lutz, denominando-o de *Zimonema brasiliensis*. Desde então, esta patologia tem recebido várias denominações, mas somente em 1930, Almeida cria o gênero *Paracoccidioides*, denominando assim, o agente causador da PCM como *Paracoccidioides brasiliensis* (*P.brasiliensis*), nome utilizado até os dias de hoje.

Taxonomicamente, o agente etiológico da PCM pertence à família *Moniliaceae*, ordem *Moniliales*, da classe *Hyphomycetes*. Contudo, uma outra classificação foi proposta, pois estudos filogenéticos empregando ferramentas moleculares posicionaram o agente etiológico da PCM, junto aos demais fungos dimórficos (*Coccidioides posadasii, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis e Histoplasma capsulatum*), como pertencentes à seguinte categoria taxonômica: Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (TAYLOR, 1995; PETERSON & SINGLER, 1998; BIALEK *et al.*, 2000; HERR *et al.*, 2001; SAN-BLAS *et al.*, 2002).

É um fungo dimórfico, e as condições que favorecem o dimorfismo do *P. brasiliensis* seriam variações térmicas (MACKINNON, 1960; NEGRONI, 1968; BORELLI, 1972; PADILHA-GONÇALVES, 1972; RESTREPO, 1985; CONTI-DIAZ & RILLA, 1989).

P.brasiliensis é conhecido apenas na sua forma assexuada, saprobiota do solo (ALMEIDA, 1930). Quanto às características morfológicas, o fungo se apresenta sob a forma de levedura quando cultivado a 37°C, ou em vida parasitária, e no exame direto, pode-se verificar a presença de células ovaladas (com 1-30μm de diâmetro) (LACAZ, *et al.*, 1991) ou multibrotantes, com aspecto de "roda de leme".

Em vida saprofítica ou quando cultivado a 25°C, o *P.brasiliensis* apresenta-se sob a forma de micélio, com hifas hialinas delgadas e septadas.

Geograficamente a doença está restrita a países da América Latina como Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (FRANCO *et al.*, 1987 e RESTREPO, 1990), sendo a micose sistêmica mais comum no Brasil (WANKE & LONDERO, 1994). Estudos que caracterizam as áreas de maior prevalência da PCM mostram que esta é encontrada em locais de floresta úmida - tropicais e subtropicais, com temperaturas variando entre 17 e 24°C, índices pluviométricos elevados (800-2.000 mm por ano) e com altitude média de 47 a 1.300 m, regiões com o inverno curto, grandes rios e verões chuvosos (RESTREPO, 1985).

Os aspectos epidemiológicos da PCM não estão bem definidos. Alguns autores acreditam que a micose é responsável pelos elevados índices de mortalidade em áreas rurais da América Latina. Entretanto, vários estudos relatam sua ocorrência em trabalhadores de áreas industriais e em crianças que residem em regiões urbanas (GREER e RESTREPO, 1977; BLOTTA *et al.*, 1999). Atualmente acredita-se que as crianças representam em geral, 5% dos casos relatados desta micose (BLOTTA *et al.*, 1999). Em áreas classificadas como sendo de alta endemicidade, o índice anual é estimado em 3 casos por 100.000 habitantes (LONDERO & RAMOS, 1990).

Em estudo epidemiológico sobre PCM com gp43, realizado em 118 operários no Noroeste do Paraná, mostrou positividade de 43% através do teste intradérmico, sendo 98% do sexo masculino com idade entre 18 e 61 anos (FORNAJEIRO, et *al.*, 2005).

Coutinho *et al.* em 2002, publicaram um estudo sobre 3.181 óbitos por PCM no Brasil entre 1980 e 1995. Neste período a micose destacou-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica, entre as patologias infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa média de mortalidade anual foi de 1,45 casos por milhão de habitantes. O Sul com a maior taxa regional, e o Sudeste apresentaram tendência à queda e a região Centro-Oeste apresentou o segundo coeficiente mais elevado do País, com tendência a ascensão. A doença prevaleceu como endemia nas áreas rurais, e a taxa de mortalidade predominou em indivíduos do sexo masculino.

A progressão da infecção fúngica causada por *P. brasiliensis* é mais comum nos homens com idade entre 30 e 60 anos, na proporção de 13 homens para 1

mulher em áreas endêmicas (LACAZ *et al.*, 1994). Estudos sugerem que nas mulheres os hormônios femininos conferem uma proteção natural contra esta patologia. O tratamento de *P. brasiliensis* com altas concentrações de hormônio feminino (estrogênio) bloqueia a transição da fase miceliana (forma infectante do fungo) para a leveduriforme (forma parasitária) (RESTREPO *et al.*, 1984; SALAZAR *et al.*, 1988; CLEMONS *et al.*, 1989 e LOOSE *et al.*, 1983). Estes dados sugerem que a resistência das mulheres no estágio inicial da infecção seja atribuída a estes efeitos hormonais (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Blotta *et al.*, (1999) estudaram 584 pacientes com idade entre 5 e 87 anos no Estado de São Paulo, observando que os maiores índices da PCM ocorreram em homens com idade entre 41 e 50 anos, sendo que 46% destes trabalhavam em zona rural.

O *habitat* natural do *P. brasiliensis* ainda é desconhecido existindo estudos que relatam o isolamento do fungo a partir de amostras de solo, sugerindo que este é o mais provável nicho ecológico do parasita (ALBORNOZ, 1971; NEGRONI, 1966; e SILVA-VERGARA & MARTINEZ, 1990; RESTREPO *et al.*, 2001).

P. brasiliensis foi isolado inicialmente de amostra do solo por Shome e Batista (1963) no Brasil. Subseqüentes isolamentos foram obtidos na Argentina (NEGRONI, 1966), em uma fazenda na Venezuela (ALBORNOZ, 1971), sendo também isolado de ração de cachorros, provavelmente por contaminação com o solo (FERREIRA, *et al.*, 1990).

Estudos epidemiológicos demonstram o isolamento do fungo em diferentes animais. Em 1965, Grose e Transmitt isolaram o fungo do trato intestinal de três morcegos (*Artibus literatus*) na Colômbia. Gesuele, em 1989 isolou o fungo de fezes de um pingüim originário da Antártida e estudos recentes têm mostrado o isolamento do *P. brasiliensis* de vísceras de tatus, em áreas endêmicas da micose (BAGAGLI *et al.*, 2003; HEBELER-BARBOSA *et al.*, 2003).

No Brasil, Silva-Vergara *et al.*, (1998) isolaram o fungo a partir do solo coletado na entrada de uma toca de tatu em um cafezal, na região de Ibiá, Minas Gerais. Posteriormente, outras três cepas foram isoladas a partir de tatus na mesma região (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000). Bagagli *et al.*, (1998) em Botucatu, Silva-Vergara *et al.*, (1998) e Macedo *et al.*, (1998) na Serra da Mesa em Goiás confirmaram a presença de infecções por *P. brasiliensis* em tatus através de exame

histopatológico nas diferentes regiões do Brasil. Com esses relatos, fica clara a dificuldade de se localizar com precisão o *habitat* natural do fungo.

No homem, várias portas de entrada têm sido sugeridas para o *P. brasiliensis*, incluindo pele, mucosas, trato gastrointestinal e pulmões. No entanto, dados experimentais e clínicos suportam a via inalatória como a principal porta de entrada deste fungo no hospedeiro humano (MCEWEN, 1987).

Uma vez que o sistema imune entra em contato com o fungo, vários fatores podem ser coadjuvantes no mecanismo de manifestação da PCM sendo, dentre eles: carência alimentar protéica, susceptibilidade genética ao fungo, fadiga, alcoolismo, tabagismo, doenças de base concomitantes, clima, etc (RESTREPO & MONCADA, 1972).

Após a inalação de propágulos infectantes, há formação de complexo primário pulmonar com possível disseminação por via linfática e hematogênica de leveduras para diversos focos em outros órgãos e sistemas (FRANCO *et al.*, 1987 e GIRALDO *et al.*, 1976).

A progressão da infecção para doença depende do tamanho do inóculo, características de patogenicidade e virulência do fungo, bem como da qualidade e integridade do sistema imunológico do hospedeiro e, possivelmente, fatores genéticos (BRUMMER *et al.*, 1993).

A classificação clínica da PCM compreende a PCM-infecção e a PCM-doença (FRANCO *et al.*, 1987). Em pacientes com PCM-infecção, a resposta imunológica apresenta-se satisfatória e o desenvolvimento do foco infeccioso é contido, embora, ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (LACAZ *et al.*, 1959). Nesta situação, lesões fibróticas são formadas no pulmão (complexo primário pulmonar) ou em tecidos mucocutâneos e o foco infeccioso pode desaparecer (FRANCO *et al.*, 1987). Nestes locais o fungo permanece em latência, portanto viável. Após um período prolongado de tempo, em decorrência do desequilíbrio na relação hospedeiro-parasita por condições não completamente definidas, a infecção pode progredir originando os sinais e sintomas da doença, com disseminação para vários órgãos, com o aparecimento de diversas lesões; caracterizando assim, a PCM-doença (FRANCO *et al.*, 1987).

De acordo com as distintas reações imunológicas que ocorrem na PCM, os pacientes infectados foram classificados em duas formas polares: pólo hiperérgico,

que se apresenta como uma forma benigna da doença, ou seja, o paciente apresenta infecção localizada, resposta imune celular preservada, baixos títulos de anticorpos, granulomas epitelióides compactos, contendo poucos fungos viáveis, e pólo anérgico, que se apresenta como uma forma maligna da micose, e os pacientes apresentam disseminação da infecção, resposta celular deprimida, altos níveis de anticorpos, granulomas epitelióides frouxos e supurativos, com extensas áreas necróticas e abundante o número de células viáveis do fungo (LACAZ *et al.*, 1982).

Uma vez estabelecida à doença, ela manifesta-se sob duas formas clínicas: forma aguda ou sub aguda e forma crônica (FRANCO *et al.*, 1987).

A forma aguda ou sub aguda (tipo juvenil) é habitualmente severa, de evolução rápida e com disseminação sistêmica, comprometendo preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos, medula óssea) (GIRALDO *et al.*, 1976). Esta forma clínica representa cerca de 3 a 5% dos casos, sendo freqüentemente encontrada em pacientes jovens de ambos os sexos (FRANCO *et al.*, 1987). A resposta imune celular usualmente está deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos (FRANCO, *et al.*, 1987).

A forma crônica, a mais freqüentemente encontrada possui evolução lenta e manifestações pulmonares evidentes em 90% dos casos, sendo que em 25% destes os pacientes apresentam lesões restritas aos pulmões (forma unifocal). Quando ocorre a disseminação, comprometendo mais de um órgão ou sistema, caracteriza a forma multifocal (revisado por BRUMMER *et al.*, 1993). A resposta imune humoral é variável e a resposta celular é preservada (FRANCO, 1986).

Os diferentes graus de imunodepressão celular nos pacientes estão associados com as diferentes formas clínicas da PCM (MOTA *et al.*, 1985; FRANCO *et al.*, 1987 e LONDERO, 1986). Desta maneira, sugere-se que na PCM há uma correlação inversa entre a resposta imune celular do paciente e a severidade da doença, mostrando que a imunidade celular representa um dos mais importantes mecanismos de defesa do hospedeiro contra o fungo. Estudos realizados por Mota *et al.*, em 1985, sugerem que quanto mais deficiente for à resposta imune celular do paciente mais grave será a forma clínica da doença.

Laboratorialmente, a PCM é diagnosticada empregando-se métodos diretos e indiretos (sorológico). No entanto, o diagnóstico de certeza desta micose baseia-se no achado de leveduras com múltiplos brotamentos, birrefringentes, no material clínico (amostras biológicas como secreções, raspados de lesão, escarro, lavado

brônquico, lavado broncoalveolar, pús e biópsia de tecidos mucocutâneos) e no seu isolamento em cultura. Após a identificação, o fungo pode ser cultivado em meios de cultura sintéticos ou então, inoculado em animais de laboratório para posterior retrocultivo (revisado por BRUMMER *et al.*, 1993; LACAZ, 1994).

Quando são atingidos órgãos internos, os testes sorológicos são muito importantes para um diagnóstico rápido da PCM (BLUMER, *et al.*, 1984). Diferentes técnicas foram desenvolvidas para a detecção de anticorpos, dentre elas estão: imunodifusão dupla (FERRI, 1961; RESTREPO, 1966), fixação do complemento (SINGER & FAVA-NETTO, 1971), ELISA (CAMARGO *et al.*, 1984; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1984) e MELISA (revisado por SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1989). No entanto, o teste que está sendo mais utilizado é o da imunodifusão em gel de ágar (YARZABAL, 1971; NEGRONI *et al.*, 1976; CAMARGO *et al.*, 1988).

Em pacientes com neuroparacoccidioidomicose, a detecção de antígenos circulantes do fungo (gp43 e gp70) no fluído cérebro espinal por ELISA de inibição tem mostrado alta sensibilidade, com eficiência no diagnóstico (DA SILVA *et al.*, 2005).

P. brasiliensis sintetiza diversas substâncias como polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, lipídeos e glicoproteínas que reúnem características físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos.

Em 1977, Yarzabal *et al.* verificaram que os antígenos liberados no sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* formavam uma banda específica frente a soros de pacientes com PCM em teste de imunoeletroforese. Esta banda, denominada banda E, mostrou-se de importância diagnóstica pela especificidade e freqüência com que ocorre em soros de pacientes com PCM. Verificou-se, posteriormente, que a banda E era composta por dois componentes, E1 e E2. O antígeno E1, com atividade de fosfatase alcalina era revelado de forma variável, enquanto que o antígeno E2 podia ser visto na imunoeletroforese como sendo específico da PCM. A utilização deste antígeno E2, em imunodifusão, permitiu identificar reações específicas com soros de pacientes com PCM.

Em 1986, Puccia *et al.* investigaram a natureza do antígeno E2. Utilizando filtrados de cultura e cromatografia em coluna de gel filtração, obtiveram três frações (F1, F2 e F3), sendo que apenas a fração F1 mostrou-se imunorreativa em imunodifusão. Esta fração apresentou afinidade para a concanavalina A e, quando aluída desta lectina, imobilizada em coluna de Sepharose e analisada em SDS-

PAGE, revelou quatro componentes de 43, 55 e 70 kDa e, um componente de alto peso molecular, com migração difusa. Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM (PUCCIA *et al.*, 1991) demonstraram que apenas a glicoproteína com 43 kDa (gp43) era imunoprecipitada por 100% dos soros de PCM e não reagia com soros de indivíduos não infectados. Posteriormente, verificou-se que a gp43 era o principal componente antigênico presente nas frações anteriormente descritas por Restrepo e Moncada, (1974) e Yarzabal *et al.* (1977). Desde então, este componente antigênico do fungo, considerado um marcador sorológico da PCM, vem sendo utilizado no sentido de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos (CAMARGO *et al.*, 1994).

Vicentini *et al.* (1994), estudando a interação de componentes da matriz extracelular com *P. brasiliensis,* demonstraram que laminina liga-se de forma específica a células leveduriformes de *P. brasiliensis*, aumentando, *in vitro,* a adesão das células fúngicas à monocamada de células epiteliais. Como conseqüência desse tipo de interação, células leveduriformes do *P. brasiliensis* recobertas com laminina e injetadas em testículos de hamster aumentaram a virulência do fungo, resultando em doença severa. Foi demonstrado também, que a gp43, presente na superfície do fungo, era o principal ligante de laminina de forma específica e saturável, favorecendo a invasão e destruição de tecidos infectados. Entretanto, estudos realizados por André *et al.*, em 2004, mostraram que camundongos infectados com leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com laminina ocorriam diminuição da carga fúngica no pulmão, bem como da diminuição da resposta inflamatória no tecido pulmonar. Já, em 2006, Mendes-Gianini e colaboradores mostraram que além do *P. brasiliensis* ter capacidade de aderir e invadir células epteliais, os componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina), devem mediar à adesão de gp43 em células vero.

Em outros estudos, autores demonstraram que a gp43 inibe a fagocitose do fungo através da não-ativação dos macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*, sugerindo que essa molécula também estaria envolvida na inibição da ativação e na habilidade das células de matar o fungo. Baseando-se nessas observações, é sugerido que a gp43 medeie um mecanismo de escape do fungo, o que facilita o estabelecimento e o destino de infecção primária em hospedeiro suscetível (POPI, *et al.*, 2002).

Diversos modelos experimentais foram propostos para avaliar a relação parasito-hospedeiro durante infecção pelo *P. brasiliensis.* Os modelos experimentais em diferentes espécies animais têm contribuído para o estudo da resposta imune no hospedeiro a esta infecção (MOSCARDI e FRANCO 1980).

Calich *et al.* (1985), infectando diferentes linhagens de camundongos isogênicos via intraperitoneal com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, definiram um modelo experimental no qual obtiveram camundongos altamente resistentes (A/J), intermediários (BALB/c, C57Bl/10 e C3He/Fe) e suscetíveis à doença (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn).

A resposta imune contra os antígenos do fungo foi estudada nesse modelo experimental e os resultados mostraram que os animais resistentes apresentavam imunidade celular aparentemente normal, ou seja, com presença de macrófagos ativados durante todo o processo infeccioso e com poucas lesões teciduais. Por outro lado, os animais suscetíveis mostraram depressão da resposta celular, altos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e comprometimento de vários órgãos (CALICH *et al.* 1988).

Calich e Kashino (1998), estudaram a produção de monocinas (TNF-α e TGF-β), citocinas associadas à resposta imune Th1 (IL-2 e IFN-γ) e tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) em cultura de linfonodos de animais resistentes (A/Sn) e susceptíveis (B10.A), para entender os fenômenos imunoregulatórios associados à resistência e à suscetibilidade na PCM experimental.

A análise da produção de citocinas associadas aos aspectos imunopatológicos verificados em animais resistentes e suscetíveis indicaram que nesse modelo experimental de PCM, a resistência à infecção em camundongos A/Sn está relacionada com a produção de níveis elevados de IFN-γ no decorrer da infecção, padrão este compatível com uma resposta do tipo Th1. A suscetibilidade de camundongos B10.A está relacionada com baixa produção de IL-2 e IFN-γ no início da infecção, seguida da produção elevada de IL-5, IL-10 e TNF-α, padrão característico de uma resposta do tipo Th2 (Revisado por CALICH & KASHINO, 1998).

Estudos recentes, realizados por Pina *et al*, em 2006, mostraram a participação de neutrófilos na imunoregulação da secreção de anticorpos e citocinas no início da infecção por *P. brasiliensis*. A depleção de neutrófilos em camundongos

suscetíveis (B10.A) aumentou os níveis de IL-12 e IL-4 nos pulmões e aumentou a síntese de imunoglobulinas (Ig) que regulam a resposta Th2 (IgG1, IgA e IgG3). Já, em camundongos resistentes, a depleção de neutrófilos induziu o aumento de IL-12 e fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), além de aumentar, isotipos de anticorpos que regulam uma resposta do tipo Th1 (IgG2a e IgG2b). Estes resultados sugerem que os neutrófilos estão envolvidos na proteção de camundongos suscetíveis na fase inata, no entanto, estas células não participam do controle da infecção causada por *P. brasiliensis* na infecção pulmonar secundária.

Atualmente, alguns pesquisadores acreditam que diversos mecanismos imunológicos além das respostas Th1/Th2 podem levar a suscetibilidade na infecção por *P. brasiliensis*. Arruda, *et al*, em 2004, demonstraram que IL-4 é uma citocina importante que pode modular positivamente ou negativamente o padrão de suscetibilidade do hospedeiro ao *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram que a IL-4 pode exercer diferentes funções na PCM pulmonar, dependendo do padrão genético do hospedeiro. A depleção de IL-4 em camundongos suscetíveis levou ao aumento da carga fúngica pulmonar. Entretanto, em animais com padrão intermediário da doença, a depleção *in vivo* de IL-4 foi menos severa e foi associada com o aumento da produção de TNF-α e IL-12 e diminuição de IL-5, demonstrando que a IL-4 não é o principal mediador na suscetibilidade à PCM pulmonar. Outra citocina, como a IL-10 poderia estar mediando esta suscetibilidade, como descreve o mesmo grupo de pesquisa.

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante, pois, certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros, mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER & COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta de células T $CD4^+$ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo.

A ativação de uma resposta imunológica é conseqüência de uma série de interações envolvendo diferentes tipos celulares. Estudos de clones de populações de células T sugerem que as células apresentadoras de antígenos (APCs) poderiam também determinar o tipo de resposta imune.

Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com as APCs (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos),

proliferem e se diferenciem em células efetoras, pois, embora os linfócitos T reconheçam antígenos com alta especificidade, eles não são capazes de iniciar uma resposta imune (Th1/Th2) (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU *et al.*, 2000 e LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2001).

Entre as APCs, os macrófagos são mais eficientes na destruição de microrganismos devido à exarcebação de funções como fagocitose e secreção de substâncias microbicidas, como a liberação de radicais derivados do oxigênio (superóxido, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio). No entanto, as células dendríticas são mais eficientes na apresentação de antígeno, devido sua capacidade de migração.

As células dendríticas foram descritas em 1973 por Steinman e Cohn e desde então, tem interessado os pesquisadores de todo o mundo por serem capazes de determinar a especificidade e natureza da resposta imune (Th1/Th2). As células dendríticas são apresentadoras de antígenos capazes de fazer a ligação entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo as únicas entre as APCs a migrarem para os órgãos linfóides secundários, para apresentarem o antígeno aos linfócitos T "naive", tornando-as células apresentadoras de antígenos "profissionais" (WICK, 2003). Além de serem eficientes na captura do antígeno, são capazes de processá-los e apresentar seus peptídeos via MHC-II aos linfócitos T "naive" (UNANUE & ALLEN, 1987).

Está bem estabelecido que para se ter ativação de células T, é necessária a interação TCR-MHC/peptídeo, além do co-estímulo, fornecido por moléculas CD80/CD86 (LENSCHOW, *et al*, 1996). A indução de moléculas co-estimulatórias está envolvida na maturação de células dendríticas e são controladas através do reconhecimento de partículas microbianas por receptores padrão (PRRs) do sistema imune inato.

As células dendríticas estão localizadas nos sítios de exposição de antígenos, como a mucosa e tecidos periféricos. Os precursores destas células originam-se na medula óssea e constantemente migram para diversos tecidos, tais como pele (onde são denominadas de células de Langerhans), sistema gastrointestinal, respiratório, sangue e linfa. Nos tecidos periféricos, essas células são ineficientes na apresentação do antígeno e na ativação de células T, pois possuem fenótipo imaturo (GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Células dendríticas imaturas apresentam baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas MHC de classe I e II, mas

possuem grande capacidade fagocítica (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998 e GUERMONPREZ, *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Shortman e Caux em 1997, sugerem que existem diferentes populações de células dendríticas, e que em camundongos essas populações diferem no fenótipo, localização e função. Em 2001, Shortman e Wu distinguiram as populações de células dendríticas em linfóides e mielóides. Ambas expressam CD11c, MHC II e moléculas co-estimulatórias, no entanto, se distinguem pela presença de moléculas CD8α, que estão presentes nas células dendríticas linfóides ($CD11c^{+}CD8\alpha^{+}DEC205^{+}CD11b^{-}$), e ausentes nas células dendríticas mielóides ($CD11c^{+}CD8\alpha^{-}DEC205^{-}CD11b^{+}$) (SHORTMAN & CAUX, 1997; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Atualmente, Wakkach *et al.*, (2003), descreveram uma subpopulação de células dendríticas, as quais possuem morfologia de células plasmocíticas e são caracterizadas fenotipicamente pela expressão das moléculas $CD11c^{low}$, $CD45Rb^{high}$, CD80, CD86, MHC-II, DEC205, CD11b, $B220^{-}$ e $Gr1^{-}$. Células dendríticas plasmocíticas estão envolvidas na proteção contra o vírus influensa A, através da produção de IFN-γ. Além disso, estas células são capazes de migrar até os linfonodos mediastinais após infecção com o vírus (SMIT, et al., 2006).

Para que as células dendríticas se tornem eficientes APCs e sejam capazes de interagir as respostas imune inata e adaptativa, elas precisam responder a dois sinais: reconhecimento direto dos patógenos e/ou seus produtos e indiretamente através de citocinas inflamatórias (GALLUCI & MATZINGER, 2001).

A fagocitose é um passo importante na defesa contra microrganismos, devido à degradação e subseqüente apresentação de antígenos peptídicos, derivados destes patógenos microbianos. O reconhecimento do microrganismo ocorre através de receptores presentes na superfície das células, como os PRRs, e outros que reconhecem opsoninas que estão nos patógenos. Entre estes receptores, estão: Fcγ e receptores de complemento, que exibem diferentes mecanismos de fagocitose e subseqüente resposta imune celular que refletem diferentes vias de sinalização (CARON & HALL, 1998; ADEREM & UNDERHILL, 1999).

Os receptores de superfície relatados como responsáveis pela ativação e maturação das células dendríticas são: receptores "Toll-like" (TLR), receptores de citocinas, receptores de TNF (TNF-R) e receptores para a porção Fc. Atualmente, sabe-se que as células dendríticas de camundongos expressam receptores para a

porção Fc das imunoglobulinas (FcR): FcγRI (CD64), FcγRIII e FcγRII (CD32) (FANGER *et al.*, 1996 e ESPOSITO-FARESE *et al.*, 1995). Em humanos, células dendríticas derivadas de monócitos expressam principalmente FcRγII (CD32) e FcαR (CD89) (GEISSMANN, *et al.*, 2001). Além de expressarem FcRγII, expressam receptores para manose, que são mediadores na captura de complexos antígeno-anticorpo e antígenos com grande quantidade de manose ou fucose, respectivamente (MANCA *et al* 1991).

Células dendríticas podem apresentar antígenos que possuem manose em sua constituição demonstrando uma eficiência de 100 a 1000 vezes maior em relação aos antígenos que não apresentam este carboidrato (ENGERING *et al.,* 1997). Além disso, tem-se identificado β-glucana, um dos principais componentes de carboidratos de parede fúngica (BROWN & GORDON, 2003), como sendo reconhecido por dectina-1 (PRRs), presente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (BROWN & GORDON, 2001; BROWN, *et al.*, 2002; TAYLOR, *et al.*, 2002).

A dectina-1 é um receptor transmembranico da família de lectina tipo C que se liga ao componente β-glucana (ARIIZUMI, *et al.*, 2000; GANTNER, *et al.*, 2003) o qual, possui seqüências ITAM (imunoreceptor de tirosina) em sua constituição. Alguns pesquisadores mostraram que estas seqüências são necessárias para produção de citocinas pró-inflamatórias, em colaboração com TLRs, e para a indução do "burst respiratório" em resposta a ligação com β-glucana, incluindo fungos patogênicos (GANTNER, *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2003).

Após o reconhecimento de partículas, o receptor dectina-1 é capaz de mediar a fagocitose, induzir o "burst respiratório" via Syk quinase e estimular a produção de TNF-α, principalmente, em colaboração com TLR-2 (BROWN, *et al.*, 2003; GANTNER, *et al.*, 2003 e ROGERS, *et al.*, 2005).

Gersuk e colaboradores (2006) mostraram que β-glucana exposta na parede de *Aspergillus fumigatus* se liga a dectina-1. Além disso, Brown e Gordon, em 2001, mostraram que dectina-1, colabora com a resposta inflamatória através da relação com TLR2, incluindo a secreção de citocinas e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BROWN, *et al.*, 2003; GANTNER, *et al.*, 2003).

A família de TLRs, encontra-se presente tanto nas células dendríticas imaturas como em macrófagos e células endoteliais. A estimulação desses

receptores ativa componentes citoplasmáticos da via de sinalização do Fator Nuclear κB (NF-κB), o qual, por sua vez, modula a maturação das células dendríticas por um mecanismo ainda não conhecido (KAISHO & AKIRA, 2001). O reconhecimento de peptídeos via TLRs expressos nas células apresentadora de antígenos dos hospedeiros, leva ao aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, instruindo assim, o desenvolvimento antígeno-específico. No entanto, células dendríticas, dependendo de sua localização, expressam diferentes TLRs.

Os autores mostraram que células dendríticas mielóides e linfóides do fígado expressam baixos níveis de TLR 4, entretanto, células dendríticas plasmocíticas hepáticas, expressam altos níveis de TLR 9 (CREUS, *et al.*, 2005).

TLRs reconhecem estruturas conservadas chamadas de padrão de moléculas associada aos patógenos (PAMPs), por exemplo: lipoproteína bacteriana, ácido lipotéico e zimosan, que são reconhecidos por TLR 2; RNA dupla fita por TLR 3; LPS por TLR 4; flagelinas por TLR 5; RNA fita simples por TLR 7 e TLR 8, e seqüências de CpG de DNA bacteriano por TLR 9 (UNDERHILL & OZINSKY, 2002; e AKIRA & HEMMI, 2003).

A ativação de células dendríticas na imunidade inata por uma variedade de produtos microbianos, de maneira dependente de TLRs, leva a maturação destas células e produção de citocinas e quimiocinas (MEDZHITOV, 2001), as quais, influenciam na resposta imune adaptativa. Algumas citocinas induzidas por TLRs podem levar a ativação de células T regulatórias, ou podem levar a ativação de células T fenótipo Th1, a qual é uma resposta apropriada na eliminação de muitos patógenos.

Dependendo do TLR ativado, as células apresentadoras de antígenos induzem diferentes respostas imunológicas. TLR 4 promove a produção da quimiocina IP10 (proteína induzida de IFN-γ), a qual também é associada com a resposta do tipo Th1. Ao contrário, TLR 2 está relacionado com a indução de uma resposta do tipo Th2. A diferença de indução de IL-12 por TLR 2 e TLR 4 tem sido mostrada em macrófagos murinos (HIRSCHFELD, *et al.*, 2001).

TLR 2 reconhece componentes derivados de fungos patogênicos (GANTNER, *et al.*, 2003), o qual, colabora com distintos tipos de receptores, como dectina-1. Este receptor, o qual é expresso na superfície da célula, é recrutado para o compartimento fagosomal de macrófagos expostos ao zimosan (UNDERHILL, *et al.*, 1999), sugerindo que os compartimentos fagosomal/lisossomal ou

endosomal/lisossomal devem ser os principais sítios para reconhecimento de componentes microbianos por TLRs.

Ausência de sinalização intracelular via TLR-PAMPs, como em camundongos deficientes de MyD88, um adaptador comum na sinalização de TLR e IRAK-4 (kinase-4 associada a receptor de IL-1) resultam no aumento de suscetibilidade para uma variedade de microrganismos, incluindo: bactérias, como *Staphylococcus aureus* (TAKEUCHI, *et al.*, 2000; SUZUKI, *et al.*, 2002), *Listeria monocytogenes* (SEKI *et al.*, 2002) e *Mycobacterium avium* (FENG, *et al.*, 2003) fungos patogênicos como *Candida albicans* (BELLOCCHIO, *et al.*, 2004); e parasitas, como *Toxoplasma gondii* (SCANGA, *et al.*, 2002), *Leishmania major* (DE VEER, *et al.*, 2003) e o parasita intestinal *Trichiuris muris* (HELMBY & GRENCIS, 2003). Similarmente, pacientes com deficiência de IRAK-4 têm recorrentes infecções bacterianas, especialmente, aquelas causadas por bactérias piogênicas (PICARD, *et al.*, 2003 e MEDVEDEV, *et al.*, 2003).

Uma vez que as células dendríticas tenham entrado em contato através de receptores presentes na superfície destas células (BELL *et al.*, 1999), com moléculas relacionadas aos patógenos, tais como, componente da parede bacteriana (LPS), DNA bacteriano, RNA-dupla fita, sinais pró e antiinflamatórios (TNF, IL-6, IL-1, IL-10, TGF-β e prostaglandinas), sinais derivados de células T (via CD40L) (BANCHEREAU *et al.*, 2000), e seqüências de CpG não metilados (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000), estas células entram no processo de maturação, que ocorre durante a migração para os órgãos linfóides secundários, tornando-as ativadoras efetivas de células T "naive" (PALUCKA & BANCHEREAU, 2002).

Durante a maturação, as células dendríticas perdem sua capacidade de capturar e processar o antígeno, aumentando a expressão de moléculas de MHC classe II, co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54) e aumentam sua produção de IL-12 (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998 e GUERMONPREZ, *et al.*, 2002). Além disso, no processo de maturação e migração, estas células aumentam a expressão do receptor de quimiocina CCR7, ligante de CCL19 (SALLUSTO, *et al.*, 1998 e SOZZANI, *et al.*, 1998). O aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 que se ligam ao CD28 tornam as células dendríticas eficientes ativadoras de células T (GUERMONPREZ, *et al.*, 2002).

Células dendríticas maduras são capazes de produzir IL-12, que direciona a polarização de clones de células Th a secretarem citocinas do padrão Th1, as quais estão envolvidas na resposta imune protetora contra diversas infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias (MACATONIA *et al.*, 1995; TRINCHIERI, 1998; BANCHEREAU & STEINMAN 1998).

Alguns trabalhos sugerem que a polarização de uma resposta para Th1 por células dendríticas CD8α+ está diretamente relacionada com a habilidade destas células em produzirem maiores quantidades de IL-12. Já células dendríticas CD8α^- estimulariam preferencialmente um padrão de resposta Th2. Apesar desta diferença, ambas as populações de células dendríticas são eficientes em estimular células T CD4$^+$ "naive" antígeno-específicas *in vivo* (MALDONADO-LÓPEZ *et al.*, 2001). De forma contrária, um estudo em humanos demonstrou que ambas as populações de células dendríticas, mielóides e linfóides, induzem tanto a polarização de células Th1 como Th2, dependendo de seu estágio de maturação (LANGENKAMP *et al.*, 2000). Além de IL-12, as células dendríticas também podem produzir IL-18, IFN-γ e IL-10, sendo que esta última inibe o processo de maturação das mesmas, impedindo a ativação de células T nos órgãos linfóides secundários (DE SMEDT *et al.*, 1997; LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2000; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Já, no pulmão as células dendríticas CD8α negativas estimulam melhor a proliferação alogênica de células T quando comparadas com as células dendríticas CD8α^+.

Células dendríticas pulmonares, presentes no epitélio respiratório, septos alveolares e tecidos conectivos ao redor dos vasos pulmonares (HOLT, *et al.*, 1994), ao contrário das células dendríticas encontradas em outros tecidos, possuem características peculiares. Estas células são eficientes na captura do antígeno, mas não na apresentação destes aos linfócitos T (STUMBLES, *et al.*, 1998; LAMBRECHT, *et al.*, 2000 e VERMAELEN *et al.*, 2001). Esses relatos podem ser explicados através da expressão de CCR7, pois a migração de células dendríticas para os linfonodos é regulada por este receptor de quimiocina.

Estudos em camundongos deficientes para este receptor demonstraram a importância crucial da interação CCR7/CCL19, para a geração de uma resposta imune primária (FOSTER, *et al.*, 1999). Nestes camundongos deficientes, as células dendríticas não migraram eficientemente para os órgãos linfóides secundários (DELGADO, *et al.*, 2001 e MACKAY, 2000). Sugere-se que um padrão anormal de

maturação de células dendríticas pode promover processo inflamatório crônico (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1999). Então, células dendríticas maduras que falham na migração para os linfonodos devem permanecer no tecido e contribuir para a inflamação local por produzir mediadores inflamatórios e ativação de células no local.

Vários pesquisadores têm estudado as células dendríticas no trato respiratório (HOLT & SCHON-HEGRAD, 1987; POLLARD & LIPSCOMB, 1990 e HOLT, 2000). Existem evidências que células dendríticas pulmonares produzem grandes quantidades de IL-10, mediando a uma ineficiente resposta imune a antígenos respiratórios (HOLT, *et al.*, 1999 e AKBARI, *et al.*, 2001). Esta produção local de citocina imunoreguladora deve afetar a capacidade destas células em instruir efetivamente células T em resposta a patógenos invasores, e com isso, as células dendríticas pulmonares são importantes não só na iniciação da resposta imune primária pulmonar, mas também estão envolvidas na indução de tolerância, pois, sabe-se que em circunstâncias normais, o estado de tolerância para antígenos inalados é ativado através de diferentes mecanismos (HOLT, *et al.*, 1993), incluindo a produção local de IL-10 por células dendríticas.

Akbari *et al.*, em 2001 demonstraram que células dendríticas pulmonares de camundongos, quando expostos a alérgenos respiratórios, produzem grande quantidade de IL-10 e que estas células, fenotipicamente maduras ($B7^{hi}$) estimularam o desenvolvimento de células T $CD4^+$ regulatórias do tipo 1, demonstrando que a produção de IL-10 por células dendríticas pulmonares é crítica para a indução de tolerância após exposição de antígenos respiratórios. No entanto, estas células respondem a patógenos bacterianos eficientemente.

Em trabalho realizado por Bozza *et al.*, em 2002, observaram que células dendríticas pulmonares após interagirem com hifas de *Aspergillus fumigatus* induziram a produção de IL-10 e IL-4. No entanto, quando as células dendríticas pulmonares foram cultivadas com conídeos do mesmo fungo, ocorreu aumento da produção de IL-12. A captura das diferentes formas do fungo foi mediada através de diferentes receptores na superfície das células dendríticas pulmonares.

Gonzalez-Juarrero e Orme, em 2001, cultivaram células dendríticas pulmonares com *Mycobacterium tuberculosis* e observaram aumento da expressão de CD54 após 24 horas de infecção. Já, com 48 horas, foi possível observar aumento da expressão de MHC-II e CD40, além do aumento da produção de IL-12 e

estímulo da secreção de IFN-γ por células T $CD4^+$ na co-cultura. Estes resultados demonstraram que células dendríticas pulmonares na presença de *Mycobacterium tuberculosis* foram capazes de maturar e serem eficientes apresentadoras de atígenos.

Infecção intranasal com influenza A em camundongos BALB/c induziu aumento do número de células dendríticas no pulmão e causou a maturação dessas células, evidenciada pelo aumento da expressão das moléculas de MHC-II e co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40) (DAHL, *et al.,* 2004). Além disso, as células dendríticas pulmonares após capturarem o vírus, aumentaram a produção de IL-12.

Já, leveduras de *Histoplasma capsulatum*, entram nas células dendríticas através de receptores CR3, diminuindo significativamente a produção de IL-12 (MARTH & KELSALL, 1997), mostrando que diferentes vias de receptores em células dendríticas regulam a produção de citocinas em resposta a diferentes estímulos (GRABBE, *et al.*, 2000 e REIS e SOUSA, 2001).

Recentemente mostrou-se (ALMEIDA & LOPES, 2001) que células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos resistentes a PCM são altamente eficientes em induzir uma resposta do tipo Th1 com elevada produção de IFN-γ, ao contrário, células dendríticas de camundongos susceptíveis estimulam com baixa eficiência a produção de células do tipo Th1.

Overtvelt *et al.*, em 1999, observaram que células dendríticas humanas infectadas com a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* têm o seu processo de maturação afetado, com diminuição da expressão das moléculas HLA-DR e CD40. As secreções de citocinas como TNF-α e IL-6, apresentam-se diminuídas após infecção e interessantemente, a produção de IL-12 foi inibida por células dendríticas ativadas com LPS, na presença do parasito. A diminuição da produção basal de IL-12 por células dendríticas humanas já foi observada em outros patógenos como: *Leishmania donovani, Histoplasma capsulatum, Mycobacterium kansasii* (AHUJA *et al.,* 1998) e viroses (FUNGIER-VIVIER *et al.*, 1997 e GHANEKAR *et al.*, 1996).

Recentemente mostramos (ALMEIDA & LOPES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003) que células dendríticas de camundongos resistentes a PCM, quando comparados com camundongos suscetíveis, são mais eficientes em induzir uma resposta do tipo Th1 tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, Ferreira e colaboradores (2006) mostraram que células dendríticas imaturas ou ativadas com

lipopolissacarídeo (LPS), na presença de gp3 de *P. brasiliensis*, inibem a expressão de moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de IL-12.

Células dendríticas estão envolvidas diretamente na relação entre patógeno e o sistema imune do hospedeiro. O reconhecimento e ingestão do patógeno e/ou seus constituintes são acompanhados pela ativação/maturação destas células, com aumento das moléculas de MHC-II, coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86), de adesão (CD54) e de migração (CCR7), levando na maioria das vezes, a uma eficiente resposta imune do hospedeiro, com ativação de células T "naive". No entanto, alguns patógenos têm a capacidade de afetar as funções biológicas das células dendríticas através da inibição de suas moléculas de superfície, bem como da inibição da síntese de citocinas importantes na ativação de linfócitos do tipo Th1.

Como células dendríticas são as principais células iniciadoras de uma resposta imune e sabendo que a infecção pulmonar é o foco primário na PCM, resta-nos saber se há diferença, entre as linhagens de camundongos resistentes e suscetíveis, em relação à ativação, maturação e migração para órgãos linfóides de células dendríticas pulmonares (CDp), assim como a sua capacidade de fagocitar leveduras e produzir citocinas. Certamente, o entendimento dessas questões será importante para melhor conhecimento da resposta imune inata e adaptativa na PCM experimental.

OBJETIVOS

OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Estudar a interação *in vitro e in vivo*, de células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes e susceptíveis a PCM com leveduras de *P. brasiliensis* do ponto de vista de fagocitose, expressão de moléculas co-estimulatórias, citocinas liberadas e expressão dos receptores TLR-2, TLR-4 e CCR7, além da molécula adaptadora MyD88;

- Avaliar a capacidade, *in vivo*, de células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis e resistentes infectados, em migrar até os órgãos linfóides secundários (linfonodos toráxicos), bem como a capacidade de apresentação de antígeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos das linhagens A/J e B10.A, respectivamente, resistentes e susceptíveis à infecção intratraqueal por *P. brasiliensis*. Utilizamos também camundongos deficientes na expressão de TLR 4 (C57Bl/Sccr HeJ) e seu controle (C57Bl/Sccr HePas), e camundongos deficientes em TLR 2 (C57Bl/6 –TLR2KO) e seu controle (C57Bl/6), todos fêmeas, com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB-USP e criados em condições SPF ("specific patogens free").

2. Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta Pb 18 (KASHINO *et al.*, 1987) *do P. brasiliensis* para infecções intratraqueais. A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK - Alemanha), em estufa a 36ºC, com repiques semanais.

3. Antígeno

O fungo Pb18 foi dissolvido em 10 mL de PBS e agitado em vortex. Posteriormente, centrifugamos a solução de Pb18 por 5 minutos a 2000 rpm, e então, recolhemos o sobrenadante para obtenção do antígeno CFA (antígeno livre da parede de *P. brasiliensis*).

4. Dosagem de proteínas

As determinações protéicas foram realizadas segundo método proposto por Bradford (1976), que utiliza "Coomassie Brilliant Blue" (CBB) G-250 (Sigma – St. Louis – Estados Unidos) como reativo e albumina bovina (BSA) 1,0 mg/mL como padrão.

Ensaios *in vitro*:

5. Purificação de células dendríticas pulmonares

Células dendríticas foram purificadas do pulmão de camundongos A/J, B10.A, C57Bl/Sccr HeJ, C57Bl/Sccr HePas, C57Bl/6 e C57Bl/6- TLR2KO, conforme descrito por Gonzales-Juarrero e Orme (2001). Após perfusão do pulmão com 5mL de PBS contendo 100U/mL de heparina (ROCHE –Basiléia – Suíça), o pulmão foi macerado e incubado por 90 minutos a 37°C na presença de tampão de digestão, contendo 0.7μg/mL de colagenase IV (SIGMA – ALDRICH – St. Louis). As partículas maiores foram removidas passando a suspensão de células através de uma membrana de nylon. Posteriormente, os macrófagos foram removidos por aderência plástica, e então as células dendríticas foram incubadas com 100μL de anticorpo monoclonal anti-CD11c (MicroBeads - MACs) para separação magnética, através de seleção positiva (Fé d" OSTIANI *et al.*, 2000). Para confirmarmos a purificação das células dendríticas pulmonares, estas foram marcadas com anti-MHC-II e anti -CD11c, marcadores específicos destas células.

6. Caracterização fenotípica de células dendríticas através de citometria de fluxo

Após purificação de células dendríticas do pulmão de camundongos resistentes e suscetíveis a PCM, como descrito anteriormente, o fenótipo destas células foi analisado a partir dos seguintes marcadores: MHC-classe II, CD80, CD86, CD54 e seu marcador específico, CD11c, utilizando-se para isso, os anticorpos: anti-I-A^k (11-5.2) (0,2μg/mL) , anti-CD54 (3E2) (0,2μg/mL), anti-CD80 (16-10A1) (0,2μg/mL), anti-CD11c (HL3) (0,5μg/mL), marcados com PE (ficoeritrina) e anti-CD86 (GL1) (0,5μg/mL), marcado com FITC (isotiocianato de fluorescência), todos da B&D (USA). Foram utilizados isotipos controles para cada anticorpo utilizado.

Para marcação dos anticorpos, células dendríticas pulmonares foram contadas em câmara de Neubauer e aliquotadas ($1x10^6$ células) em PBS com 0,5% de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab – Campinas, Brasil). Posteriormente, em cada alíquota acrescentamos os anticorpos de marcação (α-MHC-II, α-CD80, α-CD86, α-CD54 e α-CD11c) e incubamos no gelo por 30 minutos. Após incubação, acrescentamos solução fixadora (2% de glicose, 1% de formaldeído, diluídos em PBS), deixando-a até análise. Posteriormente, lavamos as células marcadas com PBS para então, analisarmos a média de intensidade de fluorescência (MIF) em citometria de fluxo.

A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o aparelho FacScalibur (Becton & Dickinson, CA) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina. Foram analisados 10.000 eventos. Após a aquisição de dados, estes foram analisados utilizando o programa Cell Quest.

7. Preparação do inóculo

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas em ágar Sabouraud foram coletadas e lavadas três vezes com PBS seguidas de forte agitação em vortex. As células grandes foram sedimentadas espontaneamente e o sobrenadante contendo células pequenas foi recolhido. O número de leveduras viáveis foi ajustado em câmara de Neubauer.

8. Ensaio de fagocitose

Nos testes de fagocitose e inibição da fagocitose, células dendríticas pulmonares de camundongos A/J, B10.A, C57Bl/6 Sccr HeJ, C57Bl/6 Sccr HePas, C57Bl/6 e C57Bl/6-TLR2KO foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços e incubadas com as células leveduriformes pequenas durante 4 horas na temperatura de 37°C. O número de células foi ajustado em Camara de Neubauer, na proporção de 3 leveduras para cada célula dendrítica.

Para o teste de inibição de fagocitose, células dendríticas pulmonares de camundongos A/J e B10.A foram cultivadas na presença de manana (50 e 100µg/mL – Sigma-Aldrich, St. Louis – EUA) ou laminarina (200µg/mL – Sigma-Aldrich - EUA), bloqueadores de receptores de manose e dectina-1, respectivamente. Os reagentes foram adicionados na cultura 30 minutos antes da exposição das células às leveduras. Em ambos os ensaios, as lamínulas foram lavadas com PBS para remover as células de *P. brasiliensis* não fagocitadas e então coradas com Giemsa e analisadas em microscópio óptico (200x). O índice de fagocitose (IF) foi calculado, multiplicando-se a porcentagem das células dendríticas que fagocitaram pelo número médio de leveduras por estas células (ODA, *et al.*, 1983).

9. Coloração por Giemsa

A técnica de coloração por Giemsa (Newprov – Paraná – Brasil) tem em sua composição corantes ácido e básico, de modo que todas as estruturas celulares

possam ser coradas, conforme sua afinidade. Após a coloração, as lamínulas foram fixadas em Entellan® (MERCK – Darmstadt – Alemanha) e posteriormente, analisadas em microscópio óptico (200x).

10. Ensaio de dosagem de citocinas

As citocinas IL-10, IL-12, IL-6 e TNF-α foram dosadas a partir dos sobrenadantes de culturas de células dendríticas pulmonares, obtidas de camundongos A/J, B10.A, C57Bl/6 Sccr HeJ, C57Bl/6 Sccr HePas, C57Bl/6 e C57Bl/6 – TLR2KO. As células foram cultivadas em placas de 24 orifícios na presença ou não de leveduras de *P. brasiliensis* e após 24 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a –70°C até o uso. A técnica utilizada nos ensaios foi ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais de captura e detecção contra as citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (B & D Systems). As condições adotadas no ensaio foram as seguintes:

- Sensibilização de placas de microtitulação de 96 poços com anticorpo primário diluído em PBS, de um dia para o outro a 4°C;
- Bloqueio de sítios livres do plástico com PBS contendo 1% de BSA, por 1 hora a temperatura ambiente;
- Incubação dos sobrenadantes de cultura e da curva padrão de citocinas recombinantes diluídas em PBS contendo 1% de BSA, por 2 horas a temperatura ambiente. Lavagem dos poços com PBS – Tween 20 a 0,05%;
- Adição dos anticorpos secundários conjugados a biotina , diluídos em PBS e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Lavagem dos poços;
- Incubação com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente. Lavagem dos poços;
- Revelação com o-fenilenodiamina 1mg/mL diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio pH 5,3, por 15-30 minutos;
- Bloqueio da reação com H_2SO_4 4N e leitura das densidades ópticas (DO) em leitor automático, com comprimento de onda de 492nm.
- As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

Ensaios *in vivo*:

11. Infecção intratraqueal

Os camundongos A/J e B10.A foram infectados por injeção intratraqueal (i.t.) com suspensão contendo $1x10^6$ células/mL de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50 μl de PBS. O inóculo foi preparado como descrito no item 7.

12. Microscopia eletrônica

Células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos A/J e B10.A após 6 horas de infecção com Pb18 foram fixadas de um dia para outro em 2,5% de glutaraldeído em 0,1M tampão de sódio (pH 7,2) a 4°C. Em seguida a suspensão foi lavada por 3 vezes em PBS e fixada em 2% de osmium por 2 horas. As amostras foram então desidratadas em etanol (25-100%) e cobertas com ouro (12nm). As células puderam então ser visualizadas no microscópio eletrônico GOL X-100 em aumento de 6000X (Instituto de Ciências Biomédicas – ICB I).

13. Expressão de moléculas de superfície de células dendríticas pulmonares após interação *in vivo* com *P. brasiliensis*

Células dendríticas foram obtidas do pulmão de camundongos resistentes e susceptíveis após 1, 2, 4 e 15 dias de serem infectados pelo fungo. A expressão das moléculas de superfície de células dendríticas pulmonares (MHC-classe II, CD54, CD80 e CD86) foi analisada através de citometria de fluxo, como descrito no item 6.

14. Ensaio de migração de células dendríticas após fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*

Leveduras de *P. brasiliensis* ($1x10^6$ leveduras/mL) foram suspensas em tampão carbonato 0,1M (pH 9,3) e adicionadas a 200μL de FITC diluído em DMSO (Dimetilsulfóxido – Grupo Química – Rio de Janeiro - Brasil) (WATANABE *et al.*, 1991). Após duas horas de incubação a temperatura ambiente e protegida da luz, a suspensão foi diluída e lavada 2 vezes removendo-se FITC livre. As leveduras de *P. brasiliensis* foram então diluídas em PBS, e inoculadas por via intratraqueal nos camundongos suscetíveis e resistentes. Após 3, 5, 7 e 15 dias, os animais (A/J e

B10.A) foram sacrificados e as células pulmonares assim como os linfonodos toráxicos (paratraqueal e paratímico) e o baço foram retirados e macerados. Posteriormente, as células foram marcadas com anti-CD11c-PE, analisadas por citometria de fluxo e as células $CD11c^{+}FITC^{+}$ (*P. brasiliensis* fagocitados por células dendriticas) quantificadas.

15. Ativação de linfócitos T por células dendríticas pulmonares após infecção pulmonar por *P. brasiliensis*

15.1 Imunização de camundongos para ensaio de linfoproliferação

Camundongos A/J e B10.A foram imunizados subcutâneamente no coxim plantar com 50µg do antígeno de *P. brasiliensis*, denominado de CFA (suspensão de antígenos livres da parede do *P. brasiliensis*), obtidos no sobrenadante de fungo agitado em vortex. Posteriormente, o antígeno foi adicionado ao adjuvante de Freund completo (Sigma – St. Louis, EUA), na proporção de 1:1, e os animais imunizados. Após 1 semana, os camundongos foram sacrificados e os linfonodos inguinais e poplíteos retirados. As células foram então, utilizadas no ensaio de linfoproliferação.

15.2 Ensaio de proliferação celular

Linfonodos de camundongos imunizados, como descrito anteriormente, foram macerados e as células T $CD4^{+}$ foram purificadas. A purificação foi feita através de seleção positiva em coluna magnética utilizando anti-CD4 marcado com "Microbeads" (MACS - Germany) e então, as células foram ajustadas para concentração de $2x10^{6}$ células/mL e plaqueadas a 100µL por poço em placa de 96 orifícios. Em seguida foram acrescentados à cultura o CFA, nas concentrações de 2, 5 e 10µg/mL e $6,6x10^{5}$ células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos A/J e B10.A infectados ou não (controle). As células foram incubadas por 72 horas em estufa de CO_2, a 37°C e nas últimas 16 horas foi acrescentado 1µCi de timidina triciada (Amersham Biosciences – Reino Unido) à cultura. Como controle positivo foi utilizado o mitógeno concanavalina A (1 µg/mL) (Sigma – St. Louis – Estados Unidos). Após a incubação, as células foram coletadas em coletor automático de células (cell harvester), e a radioatividade incorporada foi medida em contador de partículas beta.

16. Quantificação de citocinas

Após 1, 2, 4 e 15 dias de infecção intratraqueal, com leveduras do fungo em animais resistentes e suscetíveis, as células dendríticas pulmonares foram purificadas, como descrito no item 5 e cultivadas *in vitro* por 24 horas. Posteriormente, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos e as citocinas IL-10, IL-12, IL-6 e TNF-α foram quantificadas por ELISA de captura (item 10).

17. Análise da expressão de RNAm de TLR 2, TLR 4, CCR7 e MyD88 de células dendríticas após infecção experimental pelo *P. brasiliensis*

17.1 Extração de RNA total

As amostras de células dendríticas pulmonares de A/J e B10.A foram submetidas à extração de RNA pelo reagente Trizol (Invitrogen – Aukland, New Zealand) após 24 horas de infecção com $1x10^6$ leveduras de *P. brasiliensis*. Este reagente é uma solução monofásica de fenol e isoticionato de guanidina, o qual extrai RNA livre de DNA.

As células (livre de sobrenadantes) foram ressuspensas em 1 mL de Trizol para cada 10^7 de células e submetida a forte agitação. Posteriormente, o material foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado 200µL de clorofórmio, e então, agitamos vigorosamente com as mãos por 15 segundos e incubamos por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugamos o material (4°C – 10.630rpm – 15 minutos) para que ocorresse a separação de fases: Phenol-clorofórmio, interfase (DNA) e fase aquosa (RNA). A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionamos 500µL de álcool isopropílico para precipitarmos o RNA. Após forte agitação no vortex, o material foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugamos novamente (4°C – 10.630rpm – 10 minutos), desprezando o sobrenadante, ficando somente com o RNA precipitado.

Posteriormente, o RNA foi lavado com 1mL de Etanol 75% e centrifugado (4°C – 5.000rpm – 5 minutos). Secamos o pellet em estufa seca por 10-15 minutos e ressuspendemos em 20µL de água livre de RNAse (DEPC). As preparações de RNA total foram estocadas a temperatura de -70°C até o uso.

17.2 Quantificação do RNA total

Uma alíquota de cada preparação de RNA extraído foi quantificada pelo método espectrofotométrico a 260nm e a pureza foi avaliada em um comprimento de onda de 280/260nm (Beckman DU 640 spectrophometer, Roche, EUA). As preparações foram diluídas para 10ng/mL, ocorrendo assim, a diminuição do desvio de transcrição devido a diferentes quantidades de RNA total extraído.

17.3 Pureza do RNA total

Eletroforese em gel de agarose a 0,8% foi realizada para observamos a qualidade de extração do RNA. Utilizamos TBE 0,5x (Trisa-base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) como tampão de corrida. Além disso, como controle, realizamos reação de PCR com *Taq* DNA polimerase para observar contaminação com DNA.

17.4 Síntese da primeira fita de cDNA

Após a quantificação do RNA, foi sintetizada a primeira fita de cDNA utilizando *SuperScript e Random hexâmeros do kit SuperScripttm First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, CA, EUA). Cada reação de 4µL de volume final continha 100ng de hexâmeros, 10nM de dNTP mix e 170ng de RNA que foi incubado a 65°C durante 5 minutos e logo após, resfriados por, pelo menos, 1 minuto no gelo. Um segundo "mix" contendo 1x RT Buffer, 25mM MgCl2, 0,1M DTT, 24U de "RNAseOUT Recombinat Ribonuclease Inhibitor" foi adicionado à reação. A reação foi incubada em 25°C por 2 minutos e logo após, foi adicionado 30U de *SuperScript* e incubado sucessivamente em 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. No final da reação foi adicionado 1,2U de RNAse e incubado a 37°C por 20 minutos para remover as fitas de RNA que não foram convertidas a cDNA. As preparações de cDNA obtidas foram estocadas a -20°C até o uso.

17.5 RT-PCR semiquantitativo

A primeira fita de cDNA sintetizada foi submetida à técnica de RT-PCR semiquantitativo. O cDNA foi amplificado em uma reação de PCR, utilizando-se Taq DNA polimerase, tampão de enzima, dNTPs e iniciadores específicos. As seqüências de cDNA utilizados foram, segundo WANG *et al.*, 2000 obtidos no Gen Bank, com número de acesso para TLR2: AF124741e para TLR4: AF095353. Os

primers do RT-PCR para TLR 2: 5'-ACAGCTTACTGTGACTCTCCGCC-3' e 5'-GGTCTTGGTGTTATTATCTTGCGC-3'. Os primers utizados para TLR4 foram: 5'-GACCTCAGCTTCAATGGTGC-3' e 5'-TATCAGAAATGCTACAGTGGATACC-3'. Os primers utizados para CCR7 segundo UENO et al., 2004 foram: 5'-TGTACGTCAGTATCACCAGC-3' E 5'-TTTTCCAGGTGTGCTTCTGC-3'. Os primers para HPGRT foram: 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3' e 5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3'. Os primers para MyD88 foram: 5'-CACCTGTGTCTGGTCCATT-3" E 5'-CGCAGGATACTGGGAAAGT-3'. As condições destas reações foram padronizadas em tubos de 200µL para um volume de 25µL, contendo 1x Buffer solution, 2,0mM de MgCl2, 150µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4µM de iniciador, 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Lituânia), 25ng de cDNA e água para completar o volume final da reação. As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) programado para um ciclo de 94°C por 3 minutos, para uma completa denaturação. Seguiram-se ciclos de 94°C por 30 segundos, entre 55 e 60°C (dependendo da temperatura de associação de cada iniciador) por 30 segundos e a 72°C por 1 minuto. O número de ciclos foi padronizado a partir do nível de transcrição de cada gene a fim de evitarmos trabalhar com concentrações em platô, e para uma extensão completa dos produtos amplificados adicionou-se um passo final de 7 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,4% utilizando TBE 0,5x (Trisma base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) como tampão de corrida. As amostras foram coradas em brometo de etídio (10µg/mL) e visualizadas em luz UV. Como controle positivo, utilizamos a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPGRT), presente em todas as células eucariontes.

18. Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados obtidos foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey (ZAR, 1984). O nível de significância admitido foi de $p<0,05$, em todas as amostras analisadas.

RESULTADOS

RESULTADOS

Caracterização fenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo

Células dendríticas pulmonares purificadas foram analisadas em relação à expressão do seu marcador específico, CD11c e a molécula de MHC-II, expressa constitutivamente na superfície destas células. Através da técnica de citometria de fluxo, o perfil da população purificada, caracteriza fenotipicamente células CD11c^{high}MHC-II, ou seja, células dendríticas, como mostra a figura 1B.

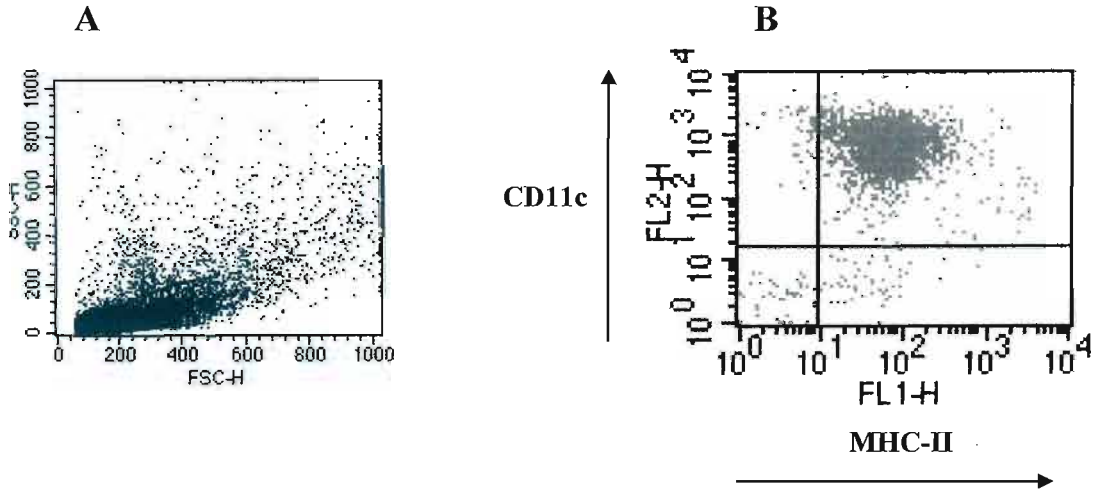


Figura 1: Fenotipagem de células dendríticas pulmonares

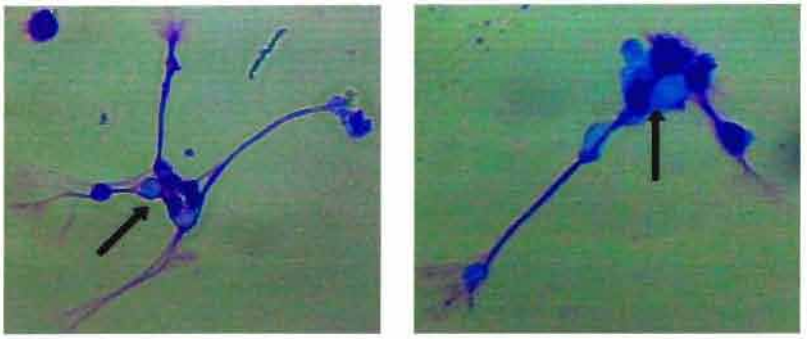
Células dendríticas pulmonares foram selecionadas segundo tamanho e granulosidade (A) e analisadas quanto à expressão de CD11c marcada com PE e MHC-II marcada com FITC (B), através de citometria de fluxo (10.000 eventos).

Ensaio de fagocitose

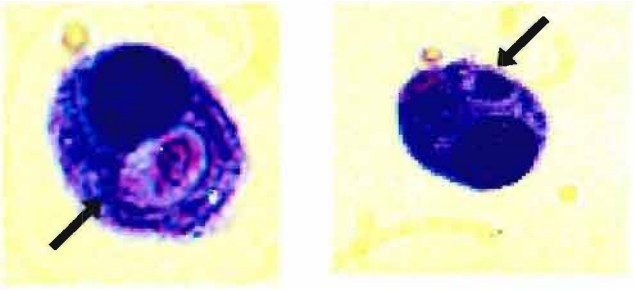
Células dendríticas obtidas do pulmão de camundongos resistentes e suscetíveis foram cultivadas com leveduras da cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis* para avaliarmos a capacidade destas células em fagocitar leveduras do fungo *in vitro*. A figura 2A mostra que as leveduras foram fagocitadas por células dendríticas pulmonares purificadas de ambas as linhagens de camundongos. Observamos aumento significativo do índice de fagocitose (IF) de células dendríticas pulmonares de animais B10.A, quando comparamos com o IF de células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos resistentes (figura 2B).

A

A/J



B10.A



B

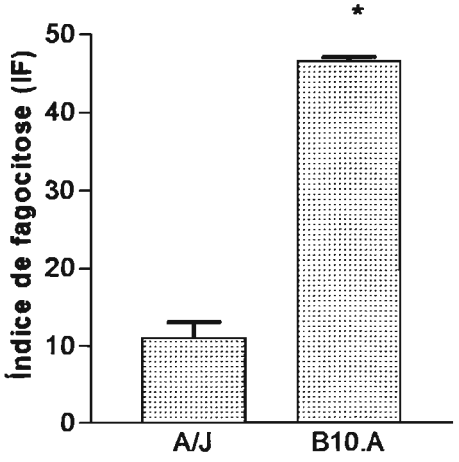


Figura 2: Fagocitose de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares *in vitro*

Células dendríticas pulmonares de camundongos A/J e B10.A foram incubadas por 4 horas com leveduras da cepa Pb18, na proporção de 3 leveduras para cada célula dendrítica pulmonar. Após 4 horas de fagocitose observamos leveduras de *P. brasiliensis* no interior destas células (200x) (Figura 2 A) (setas). A Figura 2 B mostra o IF de células dendríticas pulmonares de camundongos A/J e B10.A. Coloração por Giemsa. *$p<0,05$ em relação ao IF de células dendríticas pulmonares de A/J.

Ensaio de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos A/J e B10.A na presença de manana ou laminarina

Para estudarmos os receptores de células dendríticas pulmonares envolvidos na internalização do fungo, estas células, de ambas as linhagens de camundongos, foram incubadas com manana (50μg/mL ou 100μg/mL) ou laminarina (200μg/mL) por 30 minutos. Após este período, acrescentamos à cultura células fúngicas de *P. brasiliensis* e após 4 horas, avaliamos o IF. Como mostra a figura 3 A, ocorreu diminuição significativa de maneira dose dependente do IF de leveduras por células dendríticas pulmonares de A/J e B10.A, quando estas foram cultivadas na presença de manana, em relação ao controle (células dendríticas pulmonares na ausência de manana). Já, quando incubamos as células previamente com laminarina, observamos diminuição do IF somente na internalização de leveduras por células dendríticas pulmonares purificadas de animais suscetíveis, como mostra a figura 3 B.

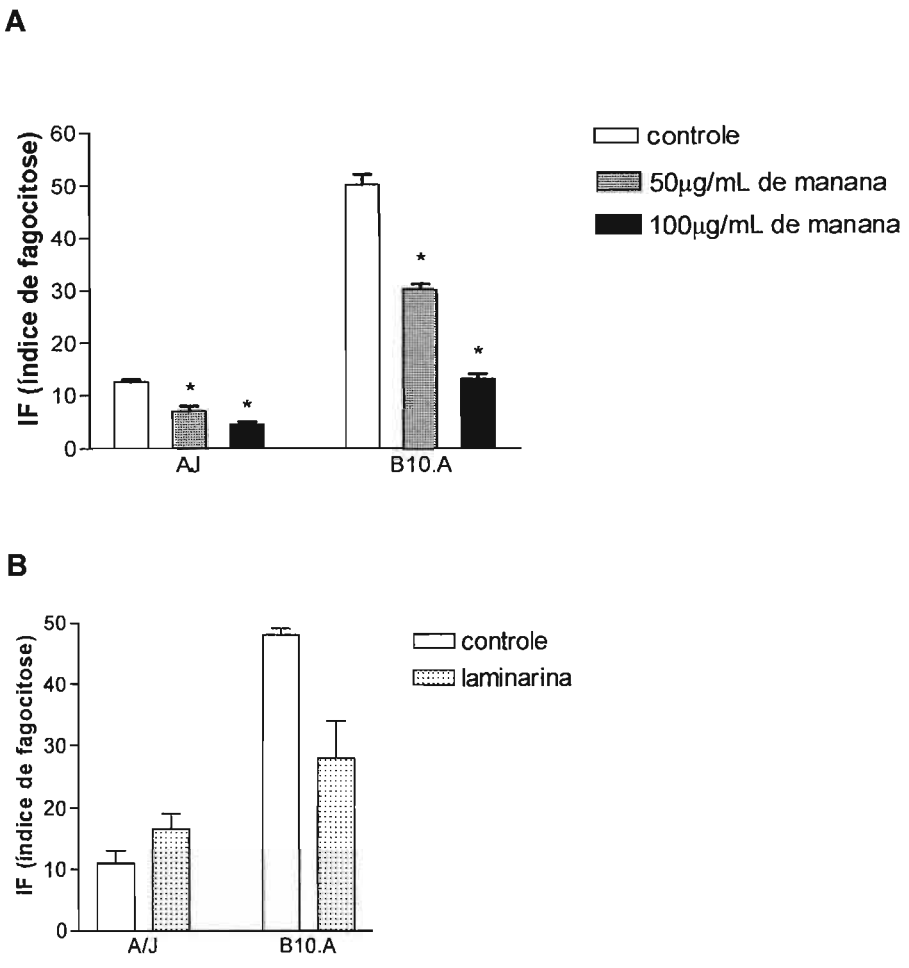


Figura 3: Inibição da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares, na presença de manana ou laminarina

As Figuras representam o IF de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes e suscetíveis, cultivadas com manana (A) ou laminarina (B). *$p<0,05$ em relação ao IF de células na ausência de manana ou laminarina (controle).

Análise da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas pulmonares por citometria de fluxo após cultura *in vitro* com *P. brasiliensis*

Para analisarmos a expressão das moléculas de superfície em células dendríticas após interação com *P. brasiliensis in vitro*, essas células foram purificadas do pulmão de camundongos resistentes e suscetíveis e após 24 horas de cultura com leveduras da cepa Pb18, a expressão de moléculas de MHC-II, CD80,

CD86 e CD54 foram analisadas por citometria de fluxo, e a média de intensidade de fluorescência (MIF) determinada.

A análise dos resultados mostrou que não ocorreu diferença significativa na expressão das moléculas analisadas em células dendríticas pulmonares de camundongos A/J. No entanto, observamos aumento significativo da expressão de CD80 e CD54 nas células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos suscetíveis, como mostra a figura 4.

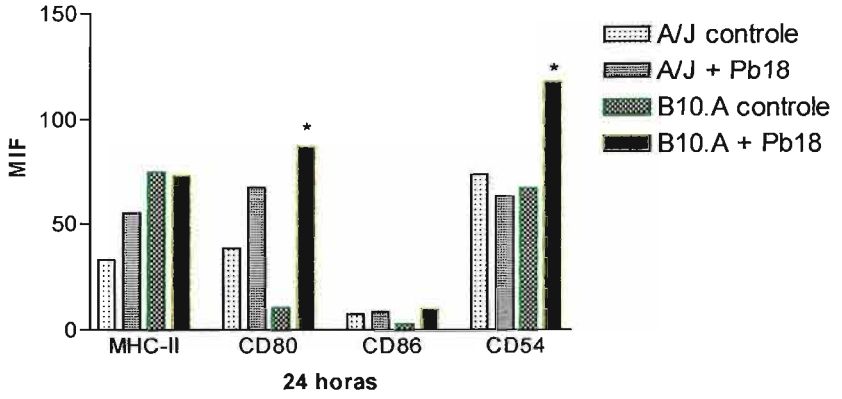


Figura 4: Expressão de moléculas de superfície em células dendríticas pulmonares
Através de citometria de fluxo, analisamos a expressão de MHC-II, CD80, CD86 e CD54 em células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos A/J e B10.A cultivadas por 24 horas com o fungo *P. brasiliensis* (Pb18). *$p<0,05$ em relação às células dendríticas purificadas, cultivadas na ausência do fungo.

Secreção de citocinas por células dendríticas pulmonares após interação *in vitro* com leveduras de *P. brasiliensis*

Células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos A/J e B10.A foram cultivadas *in vitro* por 24 horas com leveduras de *P. brasiliensis* para analisarmos o padrão de citocinas produzidas por estas células após fagocitose do fungo. Os resultados mostraram aumento significativo da produção de TNF-α por células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos suscetíveis. Em relação à produção de IL-10, observamos aumento em ambas as linhagens de camundongos após interação com o fungo, mas só foi significativo em animais B10.A. No entanto, as citocinas IL-6 e IL-12 só foram detectadas em níveis basais (Figura 5).

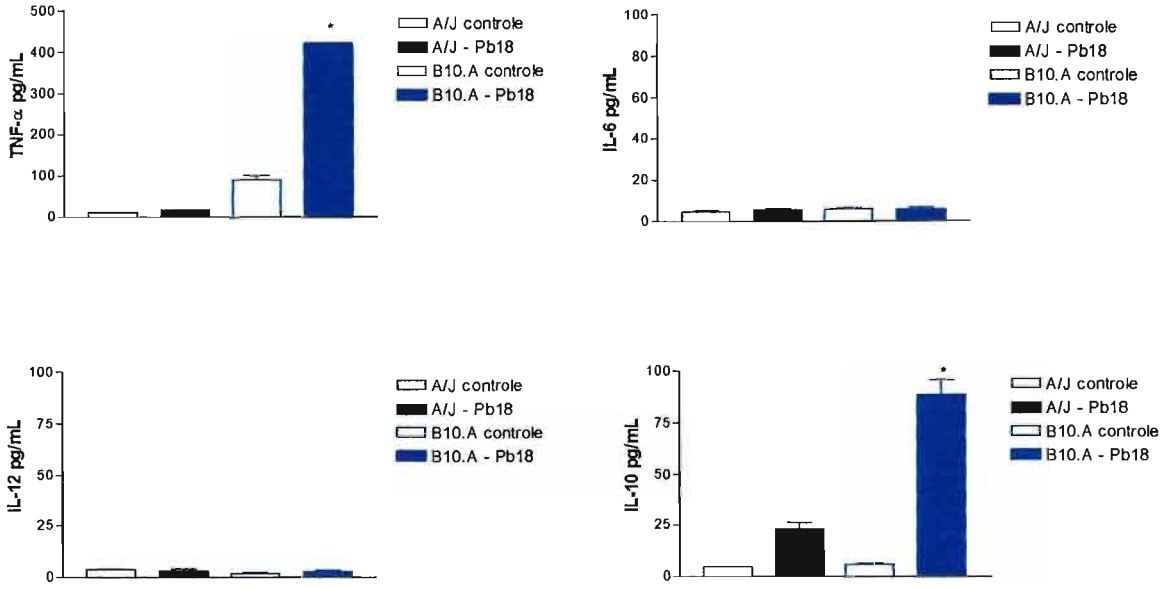
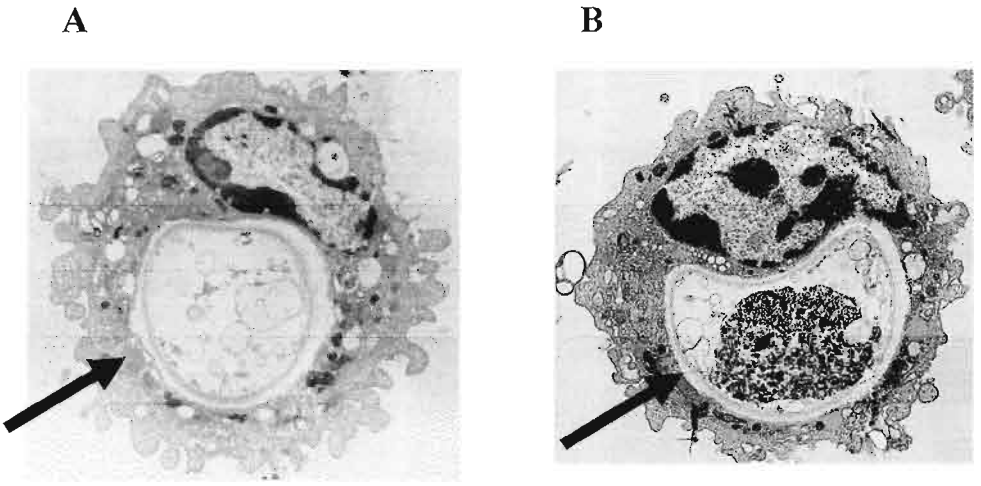


Figura 5: Dosagem de citocinas após 24 horas de fagocitose

A partir dos sobrenadantes de cultura de células dendríticas pulmonares de A/J e B10.A cultivadas com Pb18, as citocinas TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-12 foram quantificadas através da técnica de ELISA de captura. *$p<0,05$ em relação às células dendríticas pulmonares na ausência do fungo.

Microscopia eletrônica de células dendríticas pulmonares purificadas após infecção com *P. brasiliensis*

Para analisarmos a capacidade de células dendríticas pulmonares em fagocitar leveduras do fungo *in vivo*, camundongos resistentes e suscetíveis foram infectados intratraquealmente e após 6 horas, as células dendríticas pulmonares foram purificadas e analisadas através de microscopia eletrônica. Como mostram as figuras 6 A e 6 B, células dendríticas pulmonares de B10.A e A/J, respectivamente, internalizaram eficientemente leveduras de *P. brasiliensis*.



Figuras 6 A e B: Fagocitose de *P. brasiliensis in vivo*

Células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos B10.A (A) e A/J (B) após 6 horas de infecção intratraqueal com leveduras da cepa virulenta do fungo. As células foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão em aumento de 6000X. As setas indicam a levedura internalizada por células dendríticas pulmonares.

Expressão de RNAm de TLR 2, TLR 4 e MyD88 em células dendríticas pulmonares

Para analisarmos a expressão dos receptores de "toll like" 2 e 4 (TLR 2 e TLR 4) e da molécula adaptadora MyD88, importantes na resposta imune inata, células dendríticas foram purificadas do pulmão de camundongos resistentes e suscetíveis previamente infectados (24 horas) com *P. brasiliensis*. Posteriormente, foi feita a extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR semiquantitativo.

Os resultados mostraram que células dendríticas pulmonares de camundongos B10.A aumentam a expressão de TLR 2 e MyD88 após infecção com o fungo. No entanto, só observamos expressão de TLR 4 após infecção. Já, células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos A/J, aumentaram a expressão de TLR 4 e MyD88 24 horas após infecção, mas não foi possível detectarmos a expressão de TLR 2 (Figura 7).

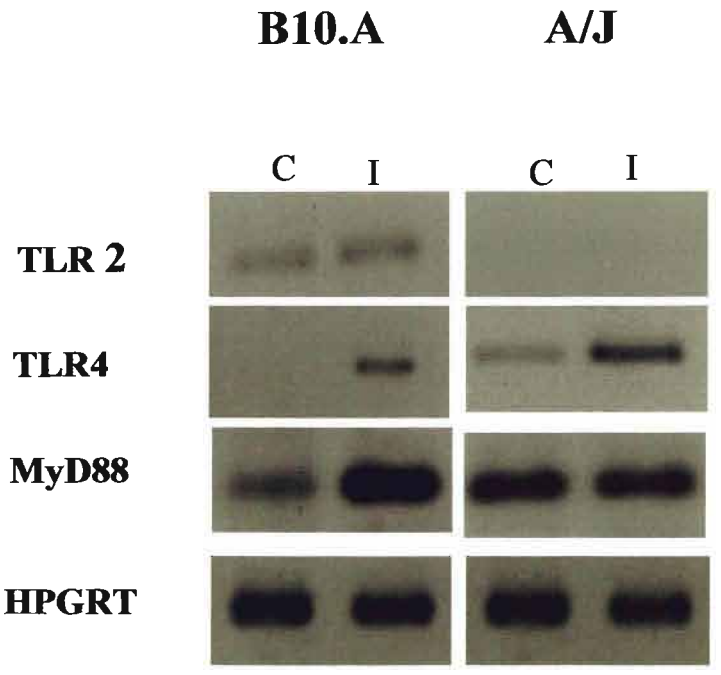


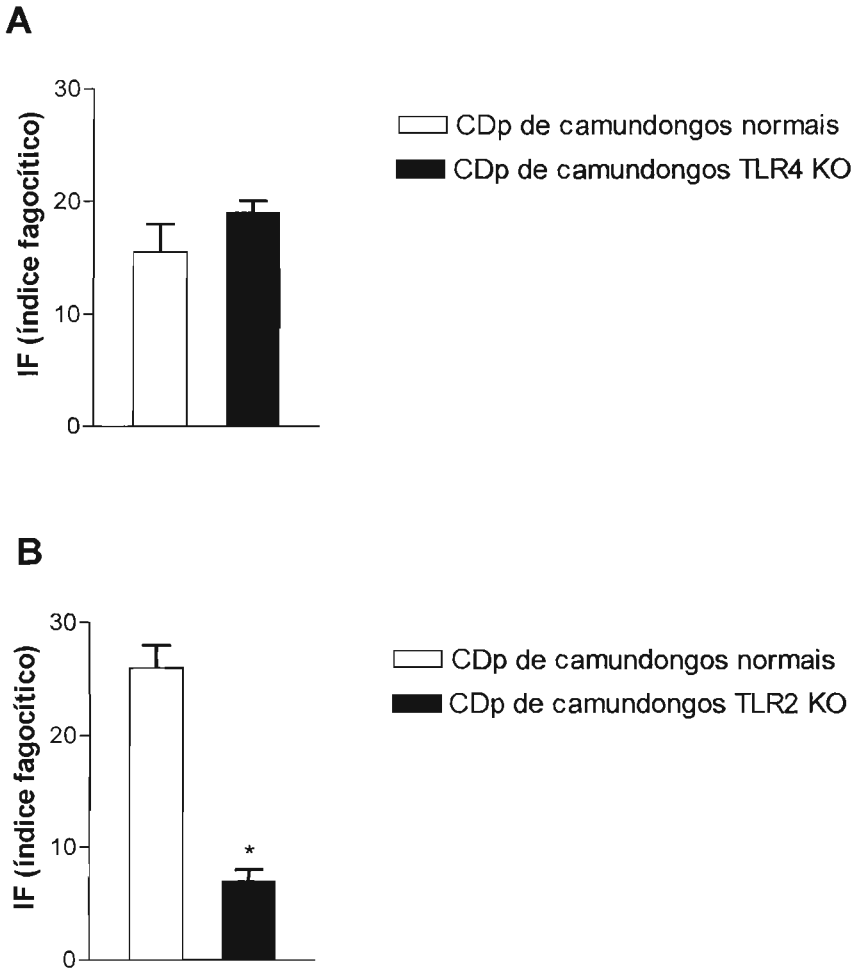
Figura 7: Expressão de TLR 2, TLR 4 e MyD88

A partir da extração do RNA total de células dendríticas de camundongos A/J e B10.A, infectados (i) ou não (c), realizamos RT-PCR e analisamos a expressão de TLR 2, TLR 4 e MyD88. Como controle, utilizamos HPGRT, presente em todas as células eucariontes.

Ensaio de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos deficientes em TLR 4 ou TLR2

Para analisarmos a capacidade fagocítica de células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR4 (TLR4 KO) ou TLR2 (TLR2 KO), estas células, bem como as de camundongos selvagens C57Bl/Sccr HePas ou C57Bl/6 foram incubadas com células fúngicas de *P. brasiliensis* e após 4 horas avaliamos o IF.

Como mostra a figura 8 A, não ocorreu diferença significativa na capacidade de fagocitose das células dendríticas purificadas de camundongos TLR4 KO, em relação ao controle (C57B/Sccr HePas). No entanto, observamos diminuição significativa do IF por células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR2 (Figura 8 B), em relação às células dendríticas pulmonares de C57B/6 (selvagem).



Figuras 8 A e B: Ensaio de fagocitose de Pb18 por células dendríticas obtidas de camundongos TLR4 KO e TLR2 KO

Células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos deficientes ou não em TLR4 (A) e TLR2 (B) foram incubadas por 4 horas com leveduras do fungo na proporção de 3 leveduras para cada célula dendrítica. Posteriormente, o IF foi calculado. *$p<0,05$ em relação ao IF de células dendríticas de camundongos selvagens (controle).

Quantificação de citocinas produzidas por células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR4

Para analisarmos o padrão de citocinas produzidas por células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR4, as células dendríticas purificadas do pulmão destes camundongos e de seu controle (C57Bl/Sccr HePas), foram cultivadas *in vitro* com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 24 horas, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos e as citocinas IL-10, IL-6, TNF-α e IL-12 quantificadas. Os resultados mostraram que após interação do fungo com as células, ocorreu aumento de IL-10 e IL-6 por células dendríticas pulmonares de ambas as linhagens de camundongos. Entretanto, observamos que células dendríticas de camundongos deficientes, não apresentam diferença significativa na secreção de TNF-α. Ao contrário, células dendríticas obtidas de camundongos normais apresentaram aumento significativo da produção destas citocina (Figura 9).

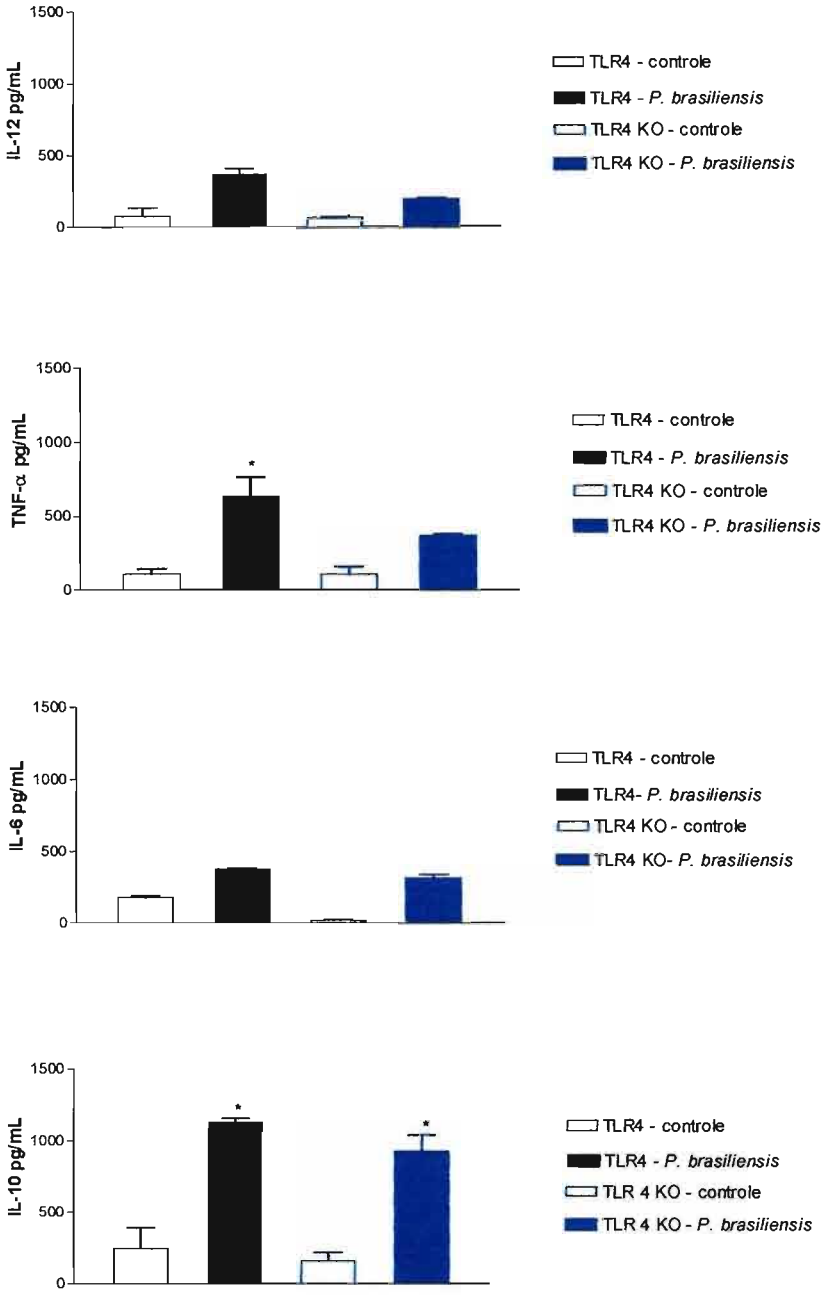
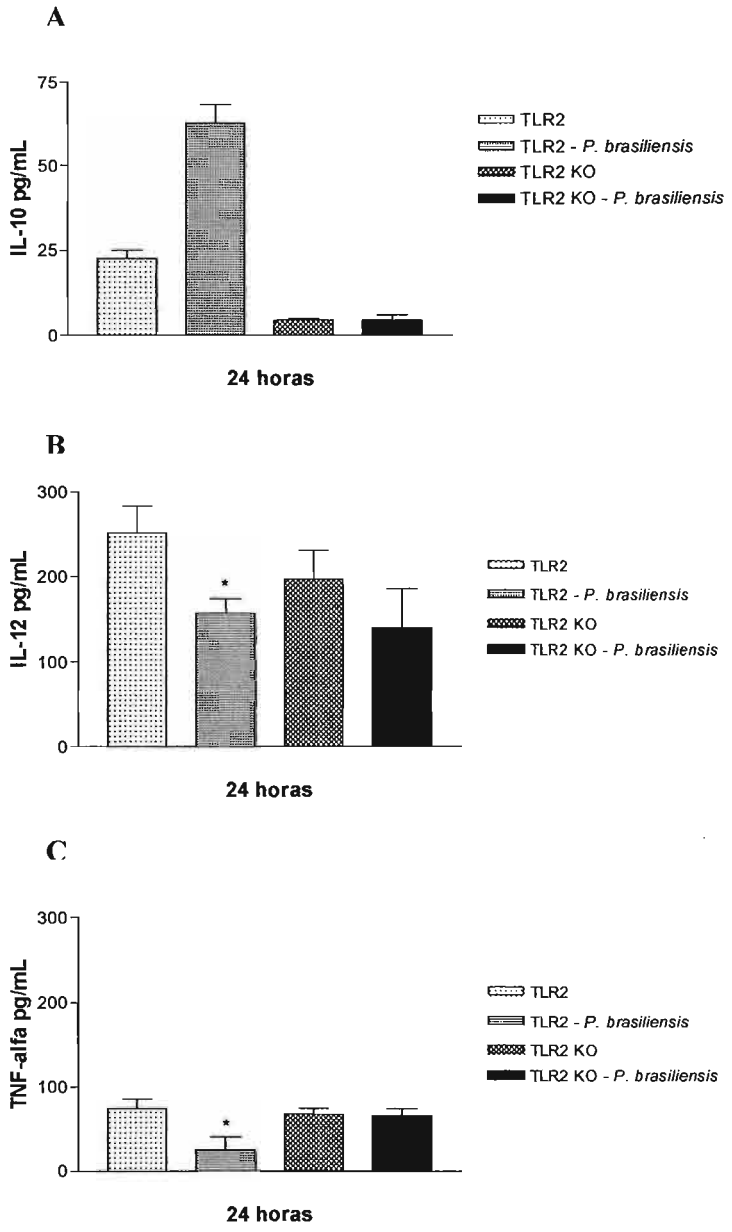


Figura 9: Produção de citocinas por células dendríticas pulmonares de camundongos nocautes para o receptor TLR 4

Após purificação das células dendríticas, estas foram cultivadas *in vitro* com Pb 18 por 24 horas e os sobrenadantes de cultura recolhidos. A quantificação das citocinas foi feita através da técnica de ELISA de captura. *$p<0,05$ em relação ao controle (células dendríticas pulmonares na ausência de estímulo com o fungo).

Quantificação de citocinas produzidas por células dendríticas pulmonares de camundongos deficientes em TLR 2

Para avaliarmos a importância da ativação de TLR2 para a produção de citocinas, camundongos deficientes desse receptor foram utilizados. Células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos deficientes para TLR2 (TLR2KO) e de seu controle (C57Bl/6) foram cultivadas *in vitro* com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 24 horas, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos e as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α quantificadas. Primeiramente, observamos que células dendriticas pulmonares de camundongos normais (C57Bl/6) na presença do fungo produziram menores quantidades de IL-12 e TNF-α, e maiores concentrações de IL-10. No entanto, quando analizamos células dendriticas de camundongos deficientes de TLR2, na presença ou ausencia do fungo, não foi possível observar alteração da produção de citocinas. Portanto, células dendriticas de camundongos deficientes de TLR2, na presença do fungo, não estimularam a produção de IL-10 como observado em células de camundongos controles (Figuras 10 A, B e C).



Figuras 10 A, B e C: Produção de citocinas por células dendríticas pulmonares de camundongos nocautes para o receptor TLR 2

Após purificação das células dendríticas do pulmão de camundongos deficientes ou não em TLR2, estas foram cultivadas *in vitro* com Pb 18 por 24 horas e os sobrenadantes de cultura recolhidos. A quantificação das citocinas foi feita através da técnica de ELISA de captura. *$p<0,05$ em relação ao controle (células dendríticas pulmonares na ausência de estímulo com o fungo).

Caracterização fenotípica de células dendríticas pulmonares por citometria de fluxo após infecção com *P. brasiliensis*

Para analisarmos o efeito da interação *in vivo* de *P. brasiliensis* com células dendríticas pulmonares em relação à expressão de marcadores de superfície, essas células foram purificadas de camundongos resistentes e suscetíveis após 1, 2, 4 e 15 dias de infecção intratraqueal com leveduras da cepa virulenta Pb18, e a expressão das moléculas de MHC-classe II, CD80, CD86 e CD54 analisadas por citometria de fluxo, e a MIF determinada.

A análise da expressão das moléculas de MHC-II mostrou aumento da expressão desta molécula após o 2º dia de infecção em células dendríticas pulmonares de A/J e B10.A. Analisando a expressão das moléculas CD80, CD86 e CD54, observamos aumento progressivo da expressão das moléculas em células dendríticas purificadas de camundongos resistentes. No entanto, observamos diminuição gradativa na expressão das mesmas moléculas analisadas em células dendríticas purificadas de animais susceptíveis (Figura 11).

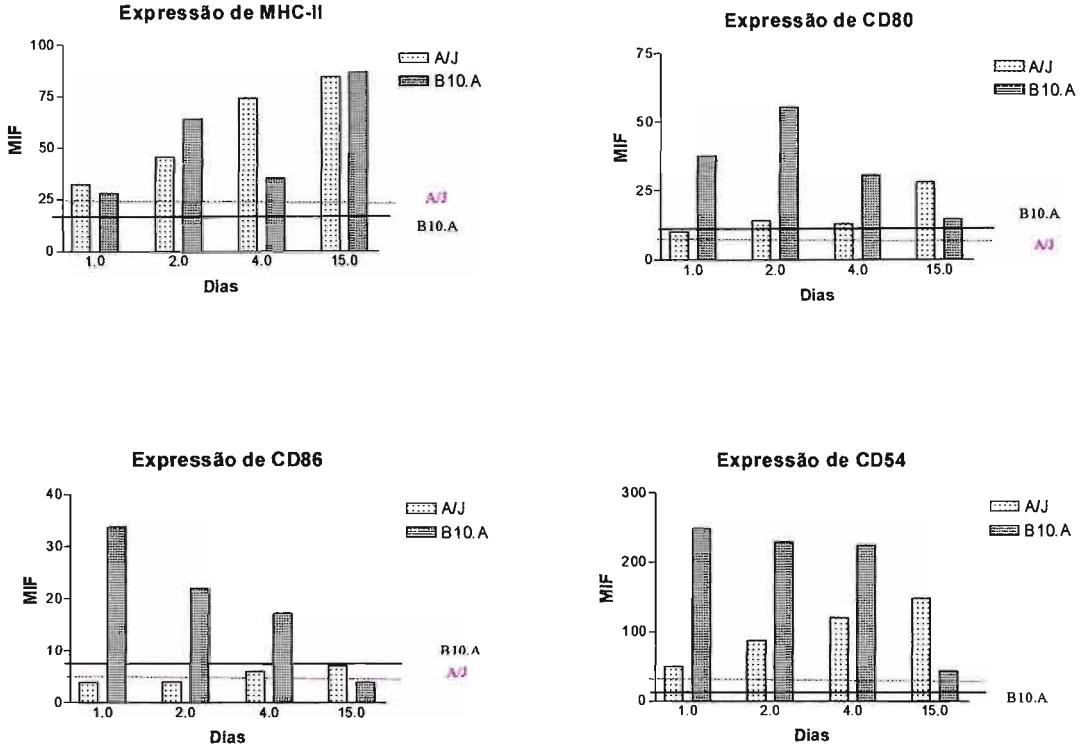


Figura 11 – Expressão de moléculas MHC-II, co-estimulatórias e de adesão em células dendríticas pulmonares após infecção com *P. brasiliensis*

Através da citometria de fluxo, analisamos a expressão de MHC-II, CD80, CD86 e CD54 em células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos resistentes e susceptíveis após 1, 2, 4 e 15 dias de infecção com o fungo *P. brasiliensis* e a MIF foi determinada. --- (controle A/J) e ___ (controle B10.A)

Produção de citocinas por células dendríticas pulmonares após infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*

Para analisarmos o padrão de citocinas produzidas por células dendríticas pulmonares após fagocitose de leveduras do fungo *in vivo*, estas células foram purificadas de camundongos A/J e B10.A após 1, 2, 4 e 15 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis*. Estas células foram cultivadas por 24 horas e posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de citocinas foi analisada por ELISA.

de IL-6 e TNF-α a partir do 2º dia de infecção. Ao contrário, analisando a síntese de citocinas por células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis, observamos diminuição das mesmas citocinas a partir do 2° dia de infecção. Entretanto, observamos aumento da produção de IL-10 nestes animais. Em relação à produção de IL-12, só foi possível detectarmos níveis basais desta citocina em células dendríticas pulmonares de ambas as linhagens de camundongos.

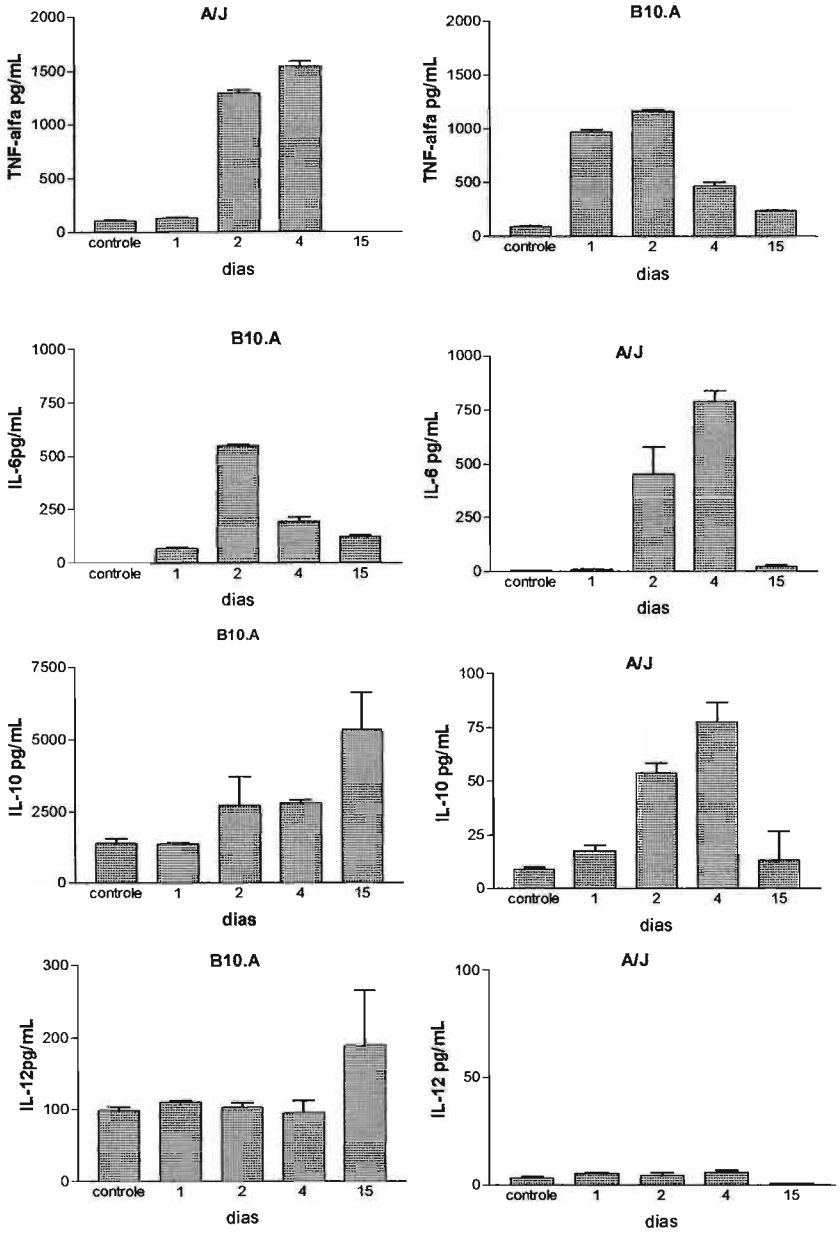


Figura 12: Produção de citocinas por células dendríticas pulmonares após infecção com *P. brasiliensis*

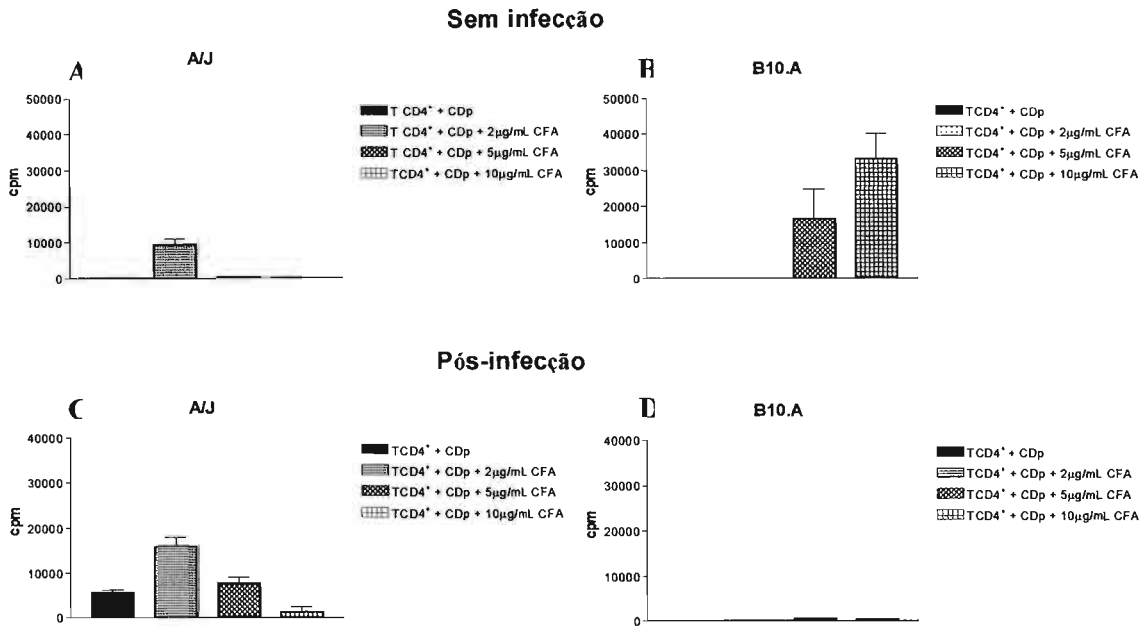
Células dendríticas pulmonares foram purificadas de camundongos resistentes e suscetíveis após 1, 2, 4 e 15 dias de infecção com *P. brasiliensis*. Após 24 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e a secreção de citocinas analisadas por ELISA de captura.

Ativação de linfócitos T $CD4^+$ por células dendríticas pulmonares

Os resultados mostraram que células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos suscetíveis não infectados (Figura 13 B) foram mais eficientes em ativar os linfícitos T $CD4^+$, quando comparamos com as células dendríticas de camundongos resistentes (Figura 13 A).

No entanto, quando analisamos células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos previamente infectados com leveduras de *P. brasiliensis*, observamos que as células dendríticas pulmonares de B10.A (Figura 13 D) perdem a capacidade de ativação dos linfócitos T $CD4^+$ na presença de diferentes concentrações do antígeno.

Já, quando analisamos a ativação dos linfócitos T $CD4^+$ por células dendríticas pulmonares obtidas de camundondos resistentes (Figura 13 C), observamos que estas células apresentam eficientemente o antígeno, mesmo após infecção.



Figuras 13 A, b, C e D: Ensaio de linfoproliferação

Células T $CD4^+$ purificadas de linfonodos de animais resistentes e suscetíveis, imunizados previamente com o antígeno CFA, foram cultivados *in vitro* na presença de células dendríticas pulmonares (CDp) purificadas de animais resistentes e suscetíveis, antes (A e B) e depois (C e D) da infecção i.t. com leveduras de Pb18.

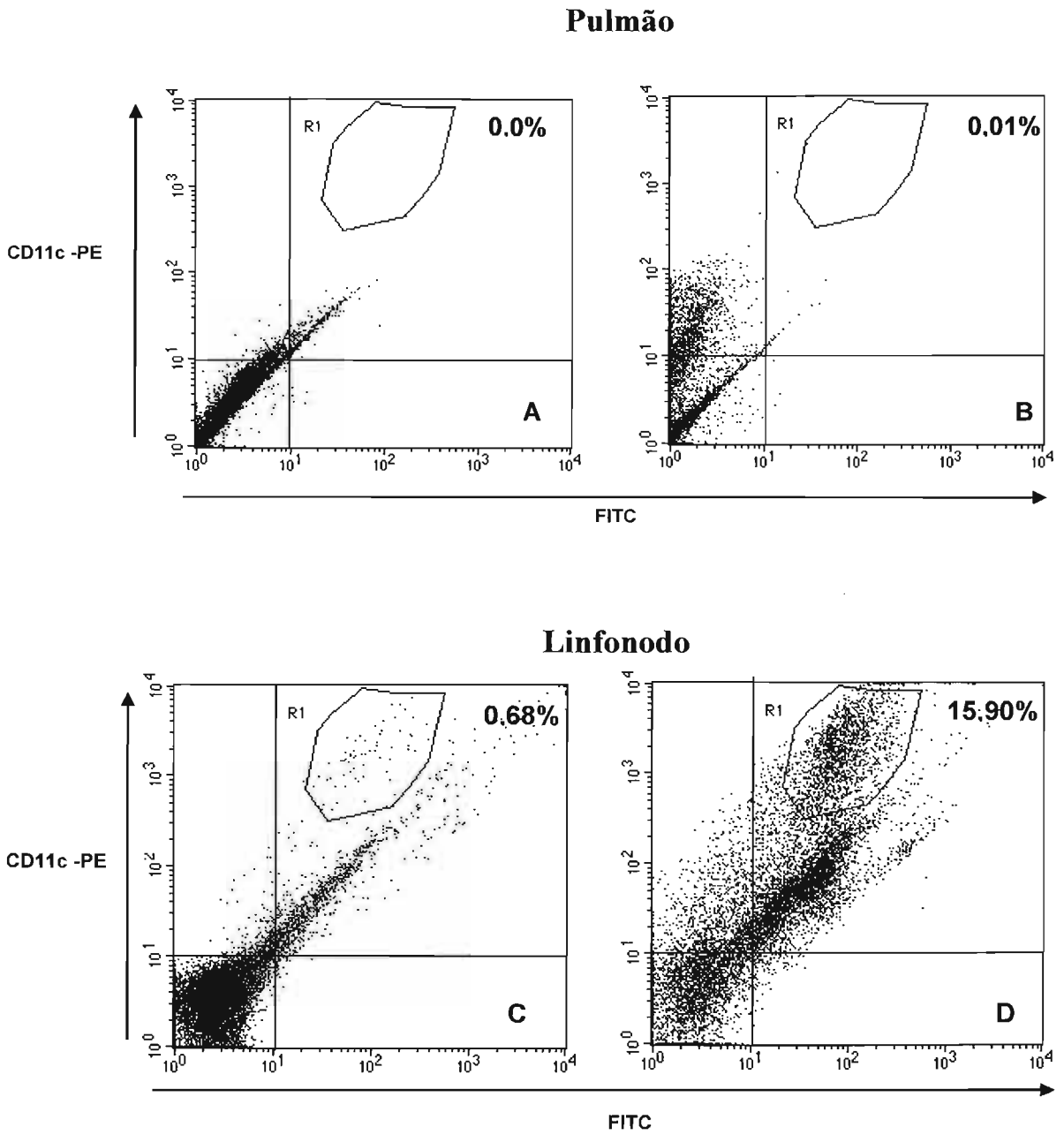
Migração de células dendríticas pulmonares para os linfonodos após infecção com *P. brasiliensis*

Analisamos a migração de células dendríticas para os linfonodos regionais (toráxicos: paratímico e paratraqueal) e baço em animais suscetíveis e resistentes a PCM após 3, 5, 7 e 15 dias de infeção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis,* marcadas com FITC. Células totais do macerado destes órgãos foram marcadas com CD11c-PE e analisadas por citometria de fluxo.

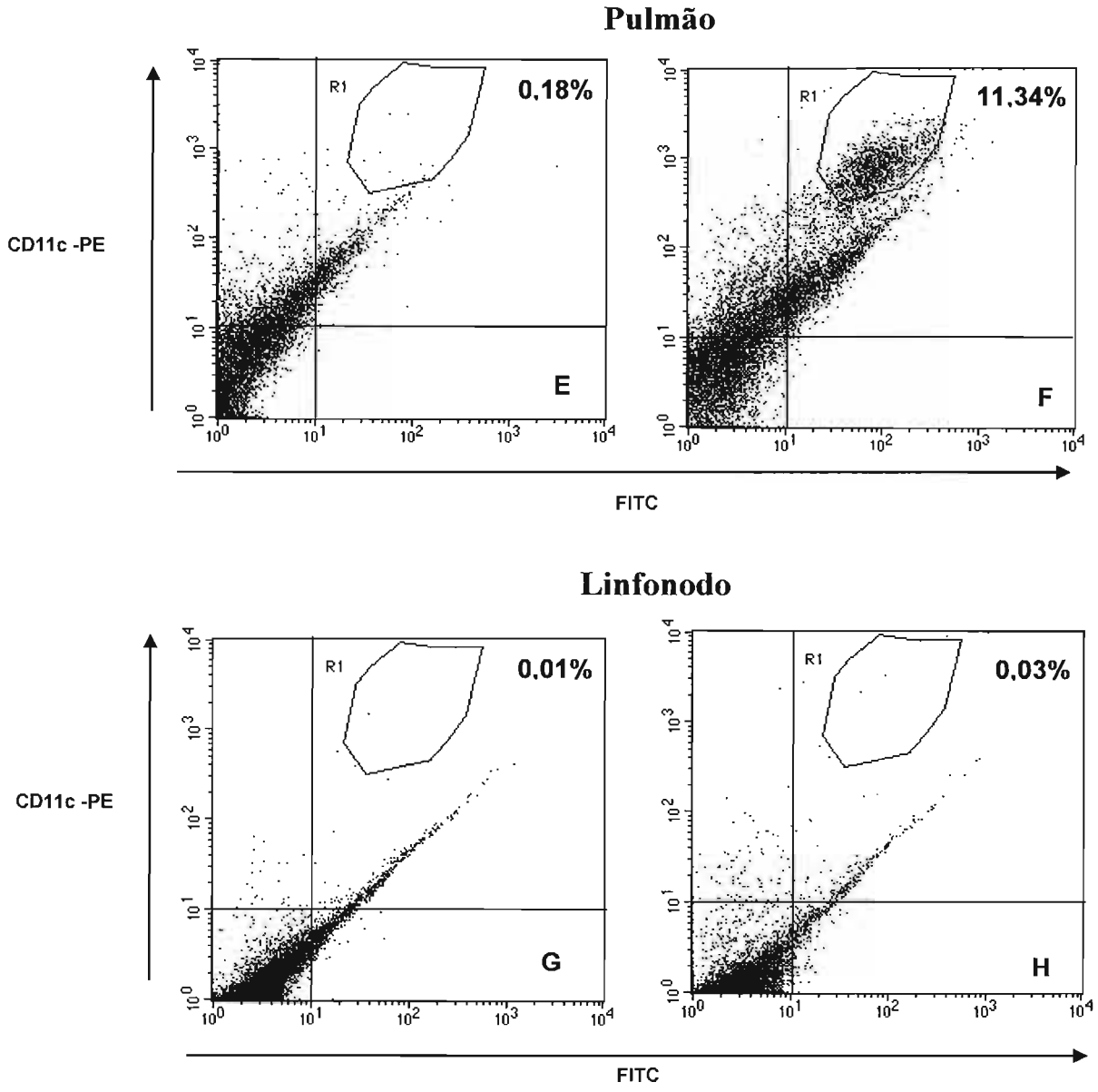
A análise mostrou migração de células dendríticas pulmonares que fagocitaram o fungo, para os linfonodos de camundongos A/J após 15 dias de infecção (Figuras 14 D), quando comparadas com o controle (células totais dos linfonodos de animais infectados somente com FITC) (Figura 14 C). Entretanto, células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos suscetíveis, não foram capazes de migrar para os linfonodos após o mesmo tempo de infecção (Figura 14

H), permanecendo no pulmão destes animais (Figura 14 F). Além disso, não detectamos células dendríticas pulmonares fagocíticas no baço de ambas as linhagens de camundongos.

A/J



B10.A



Figuras 14 A, B, C, D, E, F, G e H: Migração de células dendríticas pulmonares após infecção com *P. brasiliensis*

Camundongos resistentes e suscetíveis a PCM foram infectados intratraquealmente com leveduras de Pb18 marcadas com FITC e após 15 dias de infecção, células totais foram marcadas com CD11c-PE e a análise de dupla marcação no pulmão [(B para camundongos resistentes); (F para suscetíveis)] e nos linfonodos regionais [(D para camundongos rsistentes); (H para suscetíveis)] foi realizada por citometria de fluxo. Como controle, analisamos células dendríticas purificadas de camundongos inoculados intratraquealmente com FITC, na ausência do fungo (A e C para A/J e E e G para B10.A).

Expressão de RNAm de CCR7 em células dendríticas pulmonares

Para analisarmos se o receptor de quimiocina CCR7 estaria envolvido na capacidade de migração das células dendríticas pulmonares, o RNA foi extraído destas células, de camundongos A/J e B10.A, previamente infectados (24 horas) com *P. brasiliensis*. Posteriormente, foi feita a síntese de cDNA e RT-PCR semiquantitativo.

Os resultados mostraram que células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes, aumentam a expressão deste receptor após infecção. No entanto, células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos suscetíveis só expressam CCR7, em pouca quantidade, após 24 horas de infecção, não sendo detectado em células de animais não infectados (Figura 15).

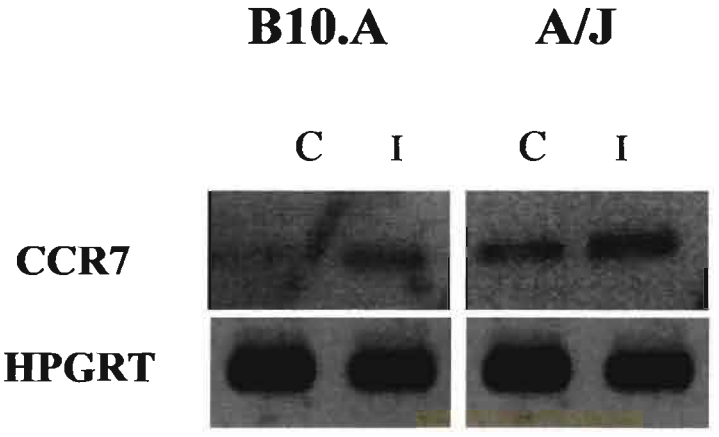


Figura 15: Expressão de CCR7

A partir da extração do RNA total de células dendríticas de camundongos A/J e B10.A, infectados (i) ou não (c), realizamos RT-PCR e analisamos a expressão de CCR7. Como controle, utilizamos HPGRT, presente em todas as células eucariontes.

DISCUSSÃO

Discussão

A importância de células dendríticas no foco primário da infecção por *P. brasiliensis* é de grande interesse, visto que, células dendríticas que estão situadas ao longo do trato respiratório na sua forma imatura (INGULLI *et al.*, 1997; NORBURY, *et al.*, 2002; STEFANOVA, *et al.*, 2002 e VAN STIPDONK *et al.*, 2003), estão posicionadas estrategicamente para capturarem o antígeno nas vias aéreas e posteriormente tornarem-se maduras, interagindo as respostas imunes inata e adaptativa, migrando assim para os órgãos linfóides secundários para ativar os linfócitos T "naive" (WICK, 2003).

A internalização de microrganismos por células dendríticas ocorre por diferentes receptores (POLLARD & LIPSCOMB, 1990; COEHAND, *et al.*, 1999 e VERMAELEN, *et al.*, 2001), e sabe-se que dependendo do receptor envolvido no processo de fagocitose, pode-se determinar o tipo de resposta imune (Th1/Th2) (BROWN e GORDON, 2001). Então, primeiramente, estudamos a capacidade de células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos resistentes e suscetíveis a PCM em fagocitar leveduras da cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) *in vitro* e *in vivo*, bem como os possíveis receptores envolvidos na internalização do fungo. A parede celular do *P. brasiliensis* é constituída principalmente por carboidratos como, manose e glucanas, que se ligam aos receptores de manose e dectina-1, respectivamente, em células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas. Além disso, esses receptores de açúcares envolvidos na fagocitose do fungo são importantes na mediação da resposta imune inata.

Os resultados mostraram que células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos suscetíveis fagocitaram mais leveduras de *P. brasiliensis*, em relação às células obtidas de camundongos resistentes. Além disso, foi possível observar que ocorreu inibição significativa da fagocitose do fungo por células dendríticas pulmonares de ambas as linhagens de camundongos, na presença de manana. No entanto, só ocorreu diminuição do índice fagocítico na presença de laminarina, bloqueador de dectina-1, em células dendríticas purificadas de camundongos suscetíveis a infecção por *P. brasiliensis*. Estes resultados sugerem que as células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis devem estar favorecendo a entrada do fungo, talvez por um mecanismo de escape do *P. brasiliensis* ou devido

ao microambiente estar facilitando a invasão, ou ainda, devido ao fungo estar entrando nas células dendríticas pulmonares pelas duas vias, manose e dectina-1.

Os resultados também sugerem o possível envolvimento do receptor de β-glucana na suscetibilidade de camundongos B10.A, visto que só ocorreu inibição da fagocitose, quando este receptor foi bloqueado com laminarina em células dendríticas destes animais. Além disso, este carboidrato pode induzir resposta antiinflamatória através da interação de TLR2 e dectina-1, favorecendo a síntese de IL-10, sendo então, importante na resposta imune inata de fungos patogênicos e na inicialização da resposta imune adaptativa (BROWN e GORDON, 2003). Já, o receptor de manose parece ter importância não só na fagocitose de microrganismos, mas também na liberação de enzimas lisossomais (OHSUMI e LEE, 1987), na indução de produção de citocinas (YAMAMOTO, *et al.*, 1997 e SHIBATA, *et al.*, 1997), além da modulação de outros receptores de superfícies das células (MURAI, *et al.*, 1995; MURAI, *et al.*, 1996 e BERNARDO, *et al.*, 1998).

Consistente com os resultados obtidos *in vitro*, células dendríticas pulmonares fagocitaram leveduras de *P. brasiliensis in vivo* eficientemente. Nós observamos que células dendríticas purificadas do pulmão de ambas as linhagens de camundongos internalizam o fungo logo no início da infecção (6 horas). Dados da literatura mostram que estas células são capazes de fagocitar *in vivo* leveduras e hifas de *Aspergillus fumigatus* logo após 3 horas de infecção (BOZZA, *et al.*, 2002).

Após o reconhecimento e internalização de estruturas microbianas, as células dendríticas iniciam o processo de maturação, aumentando a expressão de moléculas de MHC-classe II e co-estimulatórias (MOLL, *et al.*, 1993).

Devido à importância do aumento da expressão das moléculas de superfície das células dendríticas após o reconhecimento e captura do antígeno, analisamos os efeitos que o *P. brasiliensis* poderia estar causando na expressão destas moléculas in *vitro e in vivo*. A análise *in vitro*, mostrou aumento significativo da expressão das moléculas CD80 e CD54 em células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis após interação com o fungo. No entanto, *in vivo*, os resultados mostraram que, em camundongos suscetíveis à infecção, ocorre diminuição gradativa da expressão das moléculas CD80, CD86 e CD54. Já, em camundongos resistentes, observamos aumento progressivo da expressão das mesmas moléculas.

Estes resultados sugerem que as células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos resistentes, demorem mais para responderem a estímulos induzidos pelo fungo, no entanto, são mais eficientes, já que mantém a expressão das moléculas co-estimulatórias em período mais tardio da infecção. Já, em células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis, ocorre aumento das moléculas co-estimulatórias somente no início da infecção, tanto *in vitro*, como *in vivo* mostranto que essas células são hiperreativas nos momentos iniciais da interação com o fungo, porém essa reatividade tende a diminuir em tempos mais prolçongados de infecção.

Em relação às citocinas, que são proteínas importantes na determinação de uma resposta imune eficiente, analisamos a secreção de IL-10, IL-12, TNF-α e IL-6 por células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes e suscetíveis após interação com *P. brasiliensis*. *In vitro*, observamos aumento significativo da secreção de IL-10 e TNF-α somente por células dendríticas pulmonares de B10.A. No entanto, só observamos níveis basais de IL-12 e IL-6. Estes resultados mostram que células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis após fagocitose do fungo, devem estar modulando a resposta imunológica não protetora a PCM, devido a alta produção da citocina imunoregulatória (IL-10). Dados do nosso laboratório, já demonstraram que o *P. brasiliensis* bem como seu principal componente antigênico, a gp43, são capazes de inibir as principais funções biológicas de células dendríticas *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2004), como alterações na expressão das moléculas de superfície destas células e a síntese de citocinas.

Analisando a secreção das mesmas citocinas *in vivo*, observamos aumento de TNF-α e IL-6 após o 2° dia de infecção em células dendríticas do pulmão de A/J. No entanto, ocorreu diminuição gradativa destas citocinas em células dendríticas do pulmão de B10.A. Além disso, observamos aumento progressivo e significativo da produção de IL-10 por células dendríticas purificadas principalmente de camundongos suscetíveis. Em relação à produção de IL-12, só foi possível detecta-la em níveis basais, em células dendríticas pulmonares purificadas de ambas as linhagens de camundongos.

Os resultados mostraram que células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos suscetíveis são incapazes de manter a resposta mediada pela produção de TNF-α e IL-6 por muito tempo, após infecção. Já, células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes conseguem manter essa resposta por mais

tempo, em período mais tardio da infecção por *P. brasiliensis*, sendo então, mais eficientes para induzir uma resposta imune protetora a PCM.

Consistente com nossos resultados, Bozza *et al*, em 2002, mostraram que *in vivo*, células dendríticas pulmonares além de fagocitarem hifas de *Aspergillus fumigatus*, secretam altos níveis de IL-10. Evidências sugerem que células dendríticas pulmonares através da produção desta citocina, não conseguem induzir eficientemente uma resposta a antígenos respiratórios (HOLT, *et al.*, 1999 e AKBARI, *et al.*, 2001).

De acordo com dados recentes da literatura, sabemos do envolvimento de TLRs com a síntese de algumas citocinas na resposta imune inata. A ativação desta resposta mediada pelo reconhecimento via TLRs, representa uma interação entre as respostas do sistema imune inato e adquirido, através da indução da maturação de células dendríticas e direcionamento da resposta de células T "helper". A estimulação específica de TLRs resulta no aumento de IL-10 ou IL-12, polarizando a resposta de células T para Th1 ou Th2 (QI & DENNING, 2003). O reconhecimento de microrganismos por TLR2 medeia sinais que preferencialmente induzem polarização para Th2. Entretanto, ativação de TLR4 leva principalmente a proliferação de células Th1 (RE & STROMINGER, 2001).

Devido a indução de sinais antiinflamatórios através de TLRs, certos fungos patogênicos desenvolveram estratégias para bloquear o reconhecimento destes receptores e subseqüente ativação da resposta imune inata (NETEA, *et al.*, 2003). Dois mecanismos de escapes por TLRs foram identificados: imunossupressão mediada por TLR2, especialmente através da indução de IL-10 e bloqueio do reconhecimento por TLRs.

Visto a importância da produção de IL-10 dependente de TLRs, nós analisamos a expressão de receptores de TLR2 e TLR4 em células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes e suscetíveis a PCM, após infecção por *P. brasiliensis*.

Os resultados mostraram que há diferença na expressão de TLRs entre as linhagens de camundongos. Células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos resistentes não expressam TLR2, ao contrário das células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis. Além disso, células dendríticas pulmonares de animais suscetíveis não expressam TLR4 na ausência do fungo.

Para analisarmos o envolvimento de TLRs na síntese de citocinas (IL-10, IL-12, TNF-α e IL-6), purificamos células dendríticas do pulmão de camundongos deficientes em TLR4 e TLR2 e cultivamos *in vitro* com Pb18. Interessantemente, não observamos aumento da secreção de TNF-α em células dendríticas do pulmão de camundongos deficientes para TLR4. No entanto, ocorreu aumento significativo de IL-10 por células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos deficientes do mesmo receptor. Já, em camundongos deficientes de TLR2, não observamos diferença na síntese de IL-10, mesmo na presença do fungo.

Estes resultados sugerem que a produção de TNF-α está diretamente ligada à expressão de TLR4, enquanto que a produção de IL-10 está relacionada com o receptor TLR2, e consequentemente com a suscetibilidade a PCM. Dados recentes mostraram que o reconhecimento de manana de *Candida* via TLR4, ativa via de sinalização e produção de quimiocionas levando então, a proteção do hospedeiro. Já, o carboidrato glucana de *Candida*, liga-se a dectina-1, ativa TLR2, induz citocinas antiinflamatórias e consequentemente, leva a suscetibilidade. (NETEA, *et al.*, 2004).

Dillon e colaboradores (2006) mostraram que partículas de zimosan reconhecidas via dectina-1 estimulam TLR2, regulando assim a secreção de citocinas em células dendríticas e macrófagos, levando a tolerância imunológica. Além disso, os autores mostraram que as células dendríticas secretaram altos níveis de IL-10, mas pouca IL-12, e que a secreção de IL-10 foi dependente da ativação mediada por TLR2 em conjunto com dectina-1. Por outro lado, outros pesquisadores mostraram que camundongos deficientes em TLR4 são altamente suscetíveis a infecções causadas por *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* (SHAHIN, *et al.*, 1987; WOODS, *et al.*, 1988; SVANBORG, *et al.*, 2001 e SCHILLING, *et al.*, 2003), *Haemophilus influenzae* (WANG *et al.*, 2002), *Salmonella typhimurium e Klebisiella pneumoniae sepsis* (WANG, *et al.*, 1999 e BERNHEIDEN, *et al.*, 2001) e infecções causadas por fungos patogênicos, como *Candida albicans* (NETEA, *et al.*, 2002 e TADA, *et al.*, 2002), que são incapazes de estimular a produção de IL-12 e IFN-γ na ausência do reconhecimento via TLR4 (D'OSTIANI, *et al.*, 2000 e VAN DER GRAAF, *et al.*,2005).

Além disso, trabalhos recentes mostraram que *Yersinia enterocolitica, Candida albicans, Aspergillus fumigatus* e *Borrelia burgdorferi* utilizam TLR2 para induzirem a secreção de IL-10, levando a imunossupressão do hospedeiro através

da geração de células T regulatórias CD4+CD25+ (DITERICH, *et al.*, 2003; NETEA, *et al.*, 2003 e NETEA, *et al.*, 2004). Em contraste, a estimulação de TLR4 por LPS e de TLR9 por CpG induzem inibição de efeitos supressores de células T regulatórias (PASSARE & MEDZHITOV, 2003).

Posteriormente, analisamos a capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos A/J e B10.A infectados ou não com Pb18. A análise revelou que células dendríticas pulmonares de camundongos A/J foram eficientes em apresentar o antígeno CFA aos linfócitos T $CD4^+$ antes e após infecção com leveduras de *P. brasiliensis*. Já, em células dendríticas purificadas do pulmão de camundongos suscetíveis só foi possível observar apresentação do antígeno antes da infecção, ou seja, estas células perderam a capacidade de apresentar antigenos de *P. brasiliensis* após entrarem em contato com o fungo, não sendo então, capazes de ativar os linfócitos T $CD4^+$.

Analisamos também a capacidade de migração das células dendríticas dos pulmões para os linfonodos regionais, visto que, uma das principais funções destas células é a de migrar dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides secundários (MOLL, *et al.*, 1993).

Os resultados obtidos demonstraram que mesmo após 15 dias de infecção intratraqueal com leveduras da cepa virulenta do fungo as células dendríticas de camundongos suscetíveis não foram capazes de migrarem do pulmão para os linfonodos paratímico e paratraqueais (regionais), nem mesmo para o baço. No entanto, células dendríticas pulmonares obtidas de camundongos resistentes foram capazes de fagocitar e migrar até os linfonodos regionais após 15 dias de infecção. Estes resultados sugerem que células dendríticas pulmonares de B10.A possam estar perdendo uma de suas principais funções biológicas que é a de migrar para os órgãos linfóides secundários e conseqüentemente ativar os linfócitos T "naive", após interagir com o *P. brasiliensis* no principal foco de entrada do fungo.

Para entendermos os possíveis motivos da permanência destas células no pulmão, analisamos o receptor de quimiocina CCR7, um dos responsáveis pela migração das células dendríticas do pulmão para os linfonodos regionais. Os resultados mostraram que células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis expressam pouco CCR7, quando comparamos com a expressão deste receptor nas células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes, sugerindo

que este receptor poderia estar envolvido na incapacidade de migração de células dendríticas pulmonares de camundondongos suscetíveis a PCM.

Recentemente, (KHADER, *et al.*, 2006) mostraram que a migração de células dendríticas pulmonares para os linfonodos regionais após exposição à *Mycobacterium tuberculosis* foi deficiente devido à ausência de produção de IL-12 p40 e por isso, estas células foram ineficientes na ativação de linfócitos T "naive" *in vivo*. O tratamento de células dendríticas deficientes em IL-12 com o homodímero IL-12 p40, reestabeleceu a capacidade de migração destas células e consequentemente a capacidade de ativação de linfócitos T "naive", mostrando então, a importância desta citocina na ativação eficiente de células dendríticas pulmonares. Interessantemente, a análise da expressão de RNAm nestas células mostrou aumento de RNAm de IL-10 em células dendríticas deficientes de IL-12 p40 e como conseqüência, reduziu a responsividade de quimiocinas. Além disso, os autores mostraram que devido a IL-10, ocorreu inibição da migração de células dendríticas pulmonares através da falta de ligação de CCL19 com o receptor CCR7 (D'AMICO, *et al.*, 2000).

Estes dados sugerem que além das células dendríticas pulmonares purificadas de camundongos suscetíveis a PCM serem deficientes na expressão do receptor de quimiocina CCR7, a síntese de IL-10 e ausência de IL-12, podem estar envovidos também na deficiência de migração destas células para os órgãos linfóides secundários, e consequentemente, na capacidade de ativação de células T $CD4^+$ *in vivo*.

Nossos resultados demonstram que células dendríticas pulmonares interagem com o *P. brasiliensis*, fagocitando-o. No entanto, o fungo altera a expressão das moléculas co-estimulatórias, responsáveis pela ativação de células T, bem como a capacidade de migração destas células em animais suscetíveis para os linfonodos regionais. Além disso, a expressão de TLR2 em células dendríticas pulmonares somente em camundongos suscetíveis pode também ser um dos mecanismos pelo qual o *P. brasiliensis* induz maior produção de IL-10 e consequentemente cronicidade nesses animais, favorecendo a sobrevivência do fungo no hospedeiro.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Células dendríticas pulmonares purificadas de ambas as linhagens de camundongos, fagocitam eficientemente as leveduras de *P. brasiliensis in vitro* e *in vivo*. No entanto, em células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis ocorreu aumento da internalização deste patógeno, talvez, por estas células terem maior capacidade fagocítica devido à entrada do fungo se dar por duas vias, da manose e dectina-1;

- Células dendríticas pulmonares de animais suscetíveis aumentam a expressão de suas moléculas de superfície e produção de citocinas (TNF-α e IL-6) somente no início da infecção, ao contrário das células dendríticas pulmonares de camundongos resistentes. Esses resultados sugerem que as células dendríticas pulmonares de animais A/J sejam mais eficientes em período mais tardio da infecção, enquanto que as células dendríticas pulmonares de animais B10.A não conseguem manter a resposta em período prolongado;

- Células dendríticas pulmonares de B10.A sintetizam níveis basais de IL-12, mas aumentam progressivamente a síntese de IL-10 após infecção;

- Células dendríticas pulmonares purificadas de A/J e B10.A, expressam diferentes receptores "toll like" após infecção com *P. brasiliensis*. Células dendríticas pulmonares de A/J não expressam TLR2 após infecção, enquanto que células dendríticas pulmonares de B10.A aumentam a expressão do mesmo receptor após interação com o fungo;

- O receptor TLR4 está relacionado com a síntese de TNF-α, enquanto que a produção de IL-10 está relacionada ao receptor TLR2;

- A ativação de células T $CD4^+$ não foi eficiente por células dendríticas pulmonares de camundongos suscetíveis após infecção;

- A capacidade de migração das células dendríticas do pulmão para os linfonodos regionais de B10.A foi comprometida, provavelmente pela diminuição de expressão do receptor de quimiocina CCR7;

- Em conclusão, nossos resultados sugerem que *P. brasiliensis* induz células dendríticas regulatórias em camundongos suscetíveis, as quais secretam grandes quantidades de IL-10, mas pouca IL-12, induzindo diminuição da resposta de células T. Além disso, células dendríticas regulatórias parecem ser induzidas pela via de ativação de receptores de TLR2 e dectina-1, os quais promovem a síntese de IL-10, induzindo diminuição da atividade microbicida do hospedeiro, que contribui para a suscetibilidade de camundongos B10.A na infecção por *P. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEREN A. AND UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Ann. Rev. Immunol**. 17: 593-623, 1999.

2. AHUJA, S.S.; MUMMIDI, S.; MALECH, H.L. AND AHUJA, S.K. Human dendritic cell (DC)-based anti-infective therapy: engineering DCs to secret functional IFN-gamma and IL-12. **J. Immunol.** 16:868-876, 1998.

3. AKBARI, O.; DEKRUYFF, R.H. AND UMETSU, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat. Immunol**. 2: 725, 2001.

4. AKIRA, S. AND HEMMI, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunol. Lett**. 85: 85-95, 2003.

5. ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, 2: 248-252, 1971.

6. ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos do Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.

7. ALMEIDA S. R. & LOPES J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz. J. Med. Biol.** *Res.*, 34:529-537, 2001.

8. ANDRÉ, D.C.; LOPES, J.D.; FRANCO, M.F.; VAZ, C.A.C. AND CALICH, V.L.G. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes and Infection**. 6: 549-558, 2004.

9. ARISTIZABAL, B.H., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infect. Immun**. 66:5587-5591, 1998.

10. ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; PINA, A.; KASHINO, S.K.; FAZIOLI, R.A.; VAZ, C.A.C.; FRANCO, M.F.; KELLER, A.C. AND CALICH, V.L.G. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosi: Endogenous IL-4 can induce protection or exarcebation of disease depending on the host genetic pattern. **Infection and Immunity**. 72: 3932-3940, 2004.

11. ARIIZUMI, K.; SHEN, G.L.'SHIKANO, S. et al. Identification of a novel dendritic cell associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **J. Biol. Chem.** 275: 20157-20167, 2000.

12. BAGAGLI, E., SANO A, COELHO KI *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadilhos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 58: 505-512, 1998.

13. BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. DE M., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L. A. AND MONTENEGRO, M. R. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.** 41(3):217-23, 2003.

14. BANCHEREAU J., STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 392 (6673): 245-52, 1998.

15. BANCHEREAU J., BRIERE F., CAUX C., DAVOUST J., LEBECQUE S., LIU Y.J., PULENDRAN B., PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Ann. Ver. Immunol**. 18: 767-811, 2000.

16. BELL, D., YOUNG, J.W., BANCHEREAU, J. Dendritic cells. **Adv. Immunol.** 72:255-324, 1999.

17. BELLOCHIO, S. et al. The contribuition of Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. **J. Immunol**. 172:3059-3069, 2004.

18. BERNARDO, J.; BILLINGSLEA, A.M.; BLUMENTHAL, R.A.; SEETOO, K.F.; SIMONS, E.R. AND FENTON, M.J. Differential responses of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: role of CD14 and the mannose receptor. **Infect. Immun**. 66: 28-35, 1998.

19. BERNHEIDEN, M.; HEINNICH, J.M.; MIRIGO, G.; SCHUTT, C.; STELTER, F.; FREEMAN, M.; GOLENBOCK, D. AND JACK, R.S. LBP, CD14, TLR4 and the murine innate immune response to a peritoneal *Salmonella* infection. **J. Endotoxin. Res.** 7: 447-450, 2001.

20. BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A. AND BEGEROW, D. Small unit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **J. Clin. Microbiol**. 38 (9), 3190-3, 2000.

21. BLOTTA M.H., MAMONI R.L., OLIVEIRA S.J., NOUER S.A., PAPAIORDANOU, P.M., GOVEIA, A., CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J. Trop. Med. Hyg**., 61 (3): 390-394, 1999.

22. BLUMER, S.O., JALBERT, M. & KAUFMAN, L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **J. Clin. Microbiol.** 19:404-407, 1984.

23. BORELLI, D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. In: Pan American Health Organization. **Scientific Publication**, 254: 59-64, 1972.

24. BOZZA,S., R. GAZIANO, A. SPRECA, A. BACCI, C. MONTAGNOLI, P. di FRANCESCO, AND L. ROMANI. Dendritic cells transport conidia and

hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draning lympho nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. **J. Immunol.** 168:1362-1371, 2002.

25. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

26. BROWN, G.D. AND GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**. 413, 36-37, 2001

27. BROWN G.D.; TAYLOR P.R. AND REID D.M. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on mcrophages. **J. Exp. Med**. 196: 407-412, 2002.

28. BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L..; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S. AND GORDON S. Dectin-1 mediates the biological effects of β-glucans. **J. Exp. Med**. 197: 1119-1124, 2003.

29. BROWN G.D., AND GORDON S.. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**. 19: 311-315, 2003.

30. BRUMMER E., CASTAÑEDA E. & RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.** Ver. 6:89-117, 1993.

31. CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGUER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, 66:585-594, 1985.

32. CALICH, V.L.G.; FAZIOLI, R.A.; TEIXEIRA, H.C.; RUSSO, M.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; VAZ, C.A.C. Mechanisms of host-resistence to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Congress of InternationalL Society for Human and Animal Mycology, 10, Barcelona, ES, 1988. **Proceedings. Ed. J.M. Torres-Rodrigues, J.R. Prous Science, Barcellona**, 1988. p.154-9.

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

34. CAMARGO, Z. P., GUESDON, J. L., DROUHET, E. AND IMPROVISI, L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. **Mycopathologia**. 88 (1):31-7, 1984.

35. CAMARGO Z. P., UNTERKIRCHER C., CAMPOY S. P. & TRAVASSOS L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol.** 26:2147-2150, 1988.

36. CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L-.; SARAIVA, E.C.O.; TABORDA, C.P.; VICENTINI, A.P. & LOPES, J.D. Monoclonal capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 2377-2381, 1994.

37. CARON, E. AND HALL, A.. Identfication of two distintic mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science**. 10: 50-55, 1998.

38. CLEMONS, K.V., FELDMAN, D., STEVENS, D.A. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Gen. Microbiol**. 135:1607-1617, 1989.

39. COEHAND, L.; ISLER, P; SONGEON, F AND NICOD, L.P. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. **Am. J. Cell. Mol. Biol**. 21: 547, 1999.

40. CONTI-DIAZ, I. & RILLA, F.D. Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Ver. Med. Urug.**, 5: 97-103, 1989.

41. COUTINHO, Z.F., SILVA, D., LAZÉRA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R.M., SABROZA, P.C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 18(5):1441-1454, 2002.

42. CREUS, A.D.; ABE, M.; LAW, A.H.; HACKSTEIN, H.; RAIMONDI, G AND THOMSON, A.W. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogenic T cells in response to endotoxin. **J. Immunol**. 2037-2045, 2005.

43. DAHL, M.; DABBAGH, K.; LIGGITT, D.; KIM, S. AND LEWIS, D. Viral-induced T helper type 1 responses enhaced allergic disease by effects on lung dendritic cells. **Nat. Immunol**. 5: 337-43, 2004.

44. DA SILVA, S.H.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.; QUEIROZ-TELLES, F.; LOPES, J.D. AND CAMARGO, Z.P. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol**. 43: 4680-3, 2005.

45. D'AMICO, G.; FRASCAROLI, G.; BIANCHI, G.; TRANSIDICO, P.; DONI, A.; VECCHI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P. AND MANTOVANI, A. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. **Nat. Immunol**. 1: 387-391, 2000.

46. DE SMEDT T., VAN MECHELEN M., DE BECKER G., URBAIN J., LEO O., MOSER M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. **Eur. J. Immunol**. 27 (5): 1229-35, 1997.

47. D'OSTIANI, C.F.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. AND ROMANI, L. Dendritic cells diccriminate 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**. 191: 1661-74, 2000.

48. DE VEER, M.J. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **Eur. J. Immunol**. 33: 2822-2831, 2003.

49. DELGADO, M.B.; CLARK-LEWIS, I.; LOETSCHER, P.; LANGEN, H.; THELEN, M.; BAGGIOLINI, M. AND WOLF, M. Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. **Eur. J. Immunol**. 31: 699-707, 2001.

50. DILLON, S.; AGRAWAL, S.; BANERJEE, K.; LETTERIO, J.; DENNING, T.L.; OSWALD-RICHTER, K.; KASPROWICZ, D.J.; PARE, J.; VAN DYKE, T.; ZIEGLER, S.; UNUTMAZ, D. AND PULENDRAN, B. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **J. Clin. Invest**. 1-13, 2006.

51. DITERICH, I.; RAUTER, C.; KIRSCHNING, C.J. AND HARTUNG, T. *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistance via immunosuppression. **Infect. Immun**. 71: 3979-3985, 2003.

52. ENGERING, A.J.; CELLA, M.; FLUITSMA, D.M.; HOEFSMIT, E.C.M.; LANZAVECCHIA, A. & PIETERS, J. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 417:183-187, 1997.

53. ESPOSITO-FARESE M.E., SAUTES, C., DE LA SALLE, H., LATOUR S., BIEBER, T., DE LA SALLE, C., OHLMANN, P., FRIDMAN, W.T., CAZENAVE, J.P., TEILLAUD, J.L. Membrane and soluble Fc gamma RII/RIII modulate the antigen-preseting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. **J. Immunol**. 155:1725-36, 1995.

54. FANGER, N.A., WARDWELL, K., SHEN, L., TEDDER, T.F., GUYRE, P.M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated

phagocytosis by human blood dendritic cells. **J. Immunol**. 157:541-48, 1996.

55. FÈ d'OSTIANI, C., DEL SERO, G., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., SPRECA, A., MENCACCI, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., AND 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**. 15:1661, 2000.

56. FENG, C.G. et al. Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to Mycobacterium avium infection not exhibited by toll-like receptor 2 (TLR2) – and TLR4 deficient animals. **J. Immunol.** 171:4758-4764, 2003.

57. FERRI, R. G. Immunochemical study of intracellular antigens. **Hospital** 59:917-24, 1961.

58. FERREIRA, M.S., FREITAS, L.H., LACAZ, C.S., DEL NEGRO, G.M., MELO, N.T., GARCIA, N.M., ASSIS, C.M., SALEBIAN, A., HEINS-VACCARI, E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol**. 28:253-256, 1990.

59. FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D. & ALMEIDA, S.R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.,** 58:290-297, 2003.

60. FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D. AND ALMEIDA, S.R. Down-regulation of dendritic cells activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol. Lett**. 94: 107-14, 2004.

61. FERREIRA, K.S. AND ALMEIDA, S.R. Imunization of susceptible mice with gp43 pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Immunol. Lett**. 103: 121-6, 2006.

62. FORNAJEIRO, N.; MALUF, M.L.; TAKAHACHI, G. AND SVIDZINSKI, T.I. Paracoccidioidomycosis epidemiological survery using gp43, in two cities of northwestern region of Parana Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 38: 191-3, 2005.

63. FOSTER, R.; SCHUBEL, A.; BREITFELD, D.; KREMMER, E.; RENNER-MULLER, I; WOLF, E. AND LIPP, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**. 99: 23-33, 1999.

64. FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.,** 25: 5-18, 1986.

65. FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L. & MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** 20: 129-132, 1987.

66. FUNGIER-VIVIER, I.; SERVET-DELPRAT, C.; RIVAILLER, P.; RISSOAN, M.C.; LIU, Y.J. AND RABOURDIN-COMBE, C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. **J. Exp. Med**. 186:813-823, 1997.

67. GALLUCI S., MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr. Opin. Immunol.** 13:114-19, 2001.

68. GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; AND UNDERHILL, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med**. 197: 1107-1117, 2003.

69. GEISSMANN, F., LAUNAY, P., PASQUIER, B., LEPELLETIER, Y., LEBORGNE, M., LEHUEN, A., BROUSSE, N., MONTEIRO, R.C. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates

internalization and activation upon crosslinking by IgA complexes. **J. Immunol.** 166:346-52, 2001.

70. GERSUK, M.G.; UNDERHILL, M.D.; ZHU, L.; MARR, A.K. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular state. **J. Immunol**. 3717-3724, 2006.

71. GEZUELE E.. A islamiento de *Paracoccidioides sp* de heces de pinguino de la Antartida. Anais do IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Caracas, Venezuela. **Resumo nº B2**, 1989.

72. GHANEKAR, S.; ZHENG, I.; LOGAR, A.; NAVRATIL, J.;BOROWSKI, L.; GUPTA, P. AND RINALDO, C. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated *in vitro* with HIV-1 and herpes simplex virus. **J. Immunol.** 157:4028-4036, 1996.

73. GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F. & CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia,** 58: 63-70, 1976.

74. GONZALEZ-JUARRERO, M., AND ORME, M. I. Characterization of murine lung dendritic cell infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun**. 69:1127, 2001.

75. GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITCOGEL, L., THÉRY, C., AND AMIGORENA, S. Antigen Presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Anu. Rev. Immunol**. 20:621-67, 2002.

76. GRABBE, S.; KAMPGEN, E. AND SCHULER, G. Dendritic cells: multilineal and multifunctional. **Immunol. Today**. 21:431, 2000.

77. GREER D. L. & RESTREPO A. La epidemiologia de la paracoccidioidomicosis. **Bol. Of Sanit. Panam**. 83: 428-445, 1977.

78. GROSE, E. & TRANSMITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of 3 bats (*Artibens lituratus*) Colombia, S.A., **Sabouraudia**, 4: 124, 1965.

79. HEBELER-BARBOSA, F., MONTENEGRO, M. R. AND BAGAGLI, E. Virulence profiles of tem *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.** 41(2):89-96, 2003.

80. HELMBY, H. AND GRENCIS, R.K. Essential role of TLR4 and MyD88 in the development of chronic intestinal nematode infection. **Eur. J. Immunol**. 33, 2974-2979, 2003.

81. HERR, R.A.; TABORDA, P.R.; TAYLOR, J.W.; AJELLO, L. AND MENDOZA, L. Phylogenic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **J. Clin. Microbiol**. 39 (1), 309-14, 2001.

82. HIRSCHFELD, M.; WEIS, J.J.; TOSHCHAKOV, V.; SALKOWSKI, C.A.; CODY, M.J.; WARD, D.C.; QUERESH, N.; MICHALEK, S.M. AND VOGEL, S.N. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonist results in differential gene expression in murine macrophages. **Infct. Immun**. 69: 1477-1482, 2001.

83. HOLT, P.G. AND SCHON-HEGRAD, M.A. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. **Immunology**. 62:349, 1987.

84. HOLT, P.G.; OLIVER, J.; BILYK, N.; McMENAMIN, C.; McMENAMIN, P.G.; KRAAL, G. AND THEPEN, T. Downregulation of the antigen presenting cell functions of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophage. **J. Exp. Med.** 177:397, 1993.

85. HOLT, P.G.; HAINING, S.; NELSON, J.D. AND SEDGWICK, J.D. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. **J. Immunol**. 153: 256-261, 1994.

86. HOLT, P.G.; STUMBLES, A. AND McWILLIAM, A.S. Functional studies on dendritic cells in the respiratory tract and related mucosal tissues. **J. Leucocyte Biol**. 66:272, 1999.

87. HOLT, P.G. Antigen presentation in the lung. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 162:165, 2000.

88. INGULI, E.; MONDIRO, A.; KHORUTS, A. AND JENKINS, M.K. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4 (+) T cells. **J. Exp. Med**. 185: 2133-41, 1997.

89. KAISHO, T., AKIRA, S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. **Acta. Odontol. Scand**. 59(3):124-30, 2001.

90. KASHINO, S.S., CALICH, V.L.G., SINGER-VERMES, L.M., ABRAHAMSOHM, P.A., BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of tem *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v.99, p.119-128, 1987.

91. KHADER, S.A.; PARTIDA-SANCHEZ, S.; BELL, G.; JELLEY-GIBBS, D.M.; SWAIN, S.; PEARL, J.E.; GHILARDI, N.; DESAUVAGE, F.J.; LUND, F.E. AND COOPER, A.M. Interleukin-12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J.Exp. Med**. 1805-1815, 2006.

92. LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C. & MACARRON, R. Contribuição, para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidino-positivos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 1: 245-259,1959.

93. LACAZ, C.S., ZAMITH, V.A., DEL NEGRO, G., SIQUEIRA, A.M. Aspectos clínicos gerais. In: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomicose. São Paulo: **Sarvier**, p. 141-147, 1982.

94. LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed. São Paulo: **Sarvier**, 1991.

95. LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its ethiologic agent. In Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G; eds. Paracoccidioidomycosis. **CRC Press Boca Raton, da USA**. pp. 1-11, 1994.

96. LAMBRECHT, B.N.; PAUWELS, R.A. AND FAZEKAS DE St. GROTH, B.Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. **J. Immunol**. 164:2937, 2000.

97. LANGENKAMP A., MESSI M., LANZAVECCHIA A., SALLUSTO F. – Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. **Nat. Immunol.,** 1(4): 311-6, 2000.

98. LANZAVECCHIA A., SALLUSTO F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells. **Science** 290 (5489): 92-7, 2000.

99. LANZAVECCHIA, A, SALLUSTO, F.: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cells**. 106: 263-266, 2001.

100. LENSCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L. AND BLUESTONE, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Ann. Rev. Immunol**. 14: 233-58, 1996.

101. LONDERO, A T. Paracoccidioidomicose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **J. Pneumol, Brasil**. 12:41-57, 1986.

102. LONDERO, A.T., & RAMOS, C.D. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Jornal de Pneumologia**. 16:129-132, 1990.

103. LOOSE D. S., STOVER E. P., RESTREPO A, STEVANS D. A. & FELDMAN D. Estradiol binds to a receptor like cytosol protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80; 7659-7663, 1983.

104. LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. Brasil – **Med**., v.22, p.121-124, 1908.

105. MACATONIA S.E., HOSKEN N.A., LITTON M., VIEIRA P., HSIEH C.S., CULPPER J.A., WYSOCKA M., TRINCHIERI G., MURPHY K.M., O'GARRA A.. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+T cells. **J. Immunol.** 154 (10): 5071-9, 1995.

106. MACEDO R, LACERA M, TRILLES REIS M. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo Preliminar. In: Proc II Congresso Brasileiro de Micologia, Rio de Janeiro, Brasil, April 17-21, 1998: **Abstract 182.**

107. MACKAY, C.R. Chemokines: immunolgy's high impact factors. **Nat. Immunol**. 2: 95-101, 2000.

108. MACKINNON, J.E. Pathogenesis of south american blastomyces. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. 53: 487-494, 1960.

109. MALDONADO-LÓPEZ R., MALISZEWSKI C., URBAIN J., MOSER M. – Cytokines regulate the capacity of CD8alpha (+) and CD8alpha (-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells *in vivo*. **J. Immunol.**, 167(8): 4345-50, 2001.

110. MANCA, F.; FENOGLIO, D.; LI-PIRA, G.; KUNKL, A. & CELADA, F. Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complex with polyclonal antibodies. **J. Exp. Med.,** 173: 37-48, 1991.

111. MARTH, T. AND KELSALL, B.L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signalling. **J. Exp. Med**. 185:1987, 1997.

112. McEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E. AND RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol**. 25(3):165-75, 1987.

113. MEDVEDEV, A.E. et al. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. **J. Exp. Med**. 198: 521-531, 2003.

114. MEDZHITOV, R., JANEWAY, C.JR. **Innate immunity. N. Engl. J. Med.** 343:338-44, 2000.

115. MENDES-GIANNINI, M. J., CAMARGO, M. E., LACAZ, C. S. AND FERREIRA, A. W. Immunoenzymatic absrption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol**. 20(1):103-8, 1984.

116. MENDES-GIANNINI, M.J.S.; ANDREOTTI, P.F.; VICENZI, L.R. DA SILVA, J.L.M.; LENZI, H.L.; BERNARD, G.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.; GUEDES, H.L.M. AND SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, 8: 1550-59, 2006.

117. MOLL, H., H. FUCHS, C. BLANK, AND M. ROLLINGHOFF. Langerhans cells transport Leishmania major from the infect skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Eur. J. Immunol.** 23: 1595-1601, 1993.

118. MOSCARDI, M., & FRANCO, M.F. Paracoccidioidomicose experimental do camundongo. I. aspectos imunopatológicos da infecção intraperitoneal. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 22(6):286-293, 1980.

119. MOTA, N.G.S., IWASSO, M.T.R., PERAÇOLI, M.T.S., AUDI, R.C., MENDES, R.P., MARCONDES, J., MARQUES, S.A., DILLON, N.L & FRANCO, M. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 79:765-772, 1985.

120. MURAI, M.; ARAMAKI, Y AND TSUCHIYA, S. Contribution of mannose receptor to signal transduction in Fc gamma receptor=mediated phagocytosis of maouse peritoneal macrophages induced by liposomes. **J. Leuk. Biol**. 57: 687-691, 1995.

121. MURAI, M.; ARAMAKI, Y AND TSUCHIYA, S. Alpha 2-macroglobulin stimulation of protein tyrosine phosphorylation in macrophages via the mannose receptor for Fc gamma receptor-mediated phagocytosis activation. **Immunology**. 89: 436-441, 1996.

122. NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa. Med. Argent**. 53: 2381-2, 1966.

123. NEGRONI, P. Estúdios sobre la ecologia Del P*aracoccidioides brasiliensis* em la Argentina. **El. Tórax XVII**; 60-62, 1968.

124. NEGRONI R. COSTA M.R.I.E., BIANCHI O. & GALIMBERT R. Preparación y estudio de um antígeno celular de *Paracoccidioides brasiliensis* util para pruebas cutaneas. **Sabouraudia** 14: 265-273, 1976.

125. NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VONK, A.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W. AND KULLBERG, B.J. The role of Toll-like receptors in the defense against disseminated candidiasis. **J. Infect. Dis**. 185: 1483-1489, 2002.

126. NETEA, M.G.; WARRIS, A.; VAN DER MEER, J.W.; FENTON, M.J.; VERVER-JANSSEN, T.J.; JACOBS, L.E.; ANDRESEN, T.; VERWEY, T.J. AND KULLBERG, B.J *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of TLR 4-mediated signal transduction. **J. Infect. Dis**. 188: 320-326, 2003.

127. NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.M. AND KULLBERG, B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **J. Leuk. Bil**. 75: 749-755, 2004.

128. NORBORY, C.C.; MALIDE, D.; GIBBS, J.S.; BENNINK, J.R. AND YEWDELL, J.W. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells *in vivo*. **Nat. Immunol**. 3: 265-71, 2002.

129. ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANI, C.S. & TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. **Infect. Immun**. 39:497-504, 1983.

130. OSHUMI, Y AND LEE, Y.C. Mannose-receptor ligands stimulate secretion of lysosomal enzymes from rabbit alveolar macrophages. **J. Biol. Chem**. 262: 7955-7962, 1987.

131. OVERTVELT, L.V.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F. AND VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infection and Immunity**. 4033-4040, 1999.

132. PADILHA-GONÇALVES, A. Epidemiological factors in paracoccidioidomycosis. In: Pan American Health Organization. **Scientific Publication** 254: 53-58, 1972.

133. PALUCKA, K., BANCHEREAU, J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. **Current Opinion in Immunology.** 14:420-431, 2002.

134. PASSARE, C. AND MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+T cell-mediated supresion by dendritic cells. **Sciense**. 299: 1033-1036, 2003.

135. PETERSON, S.W. AND SINGLER, L. Molecular genetic variation in *Emmomsia crescens* and *Emmomsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajelomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. **J. Clin. Microbiol**. 36 (10), 2918-25, 1998.

136. PICARD, C., et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. **Science**. 299: 2076-2079, 2003.

137. PINA, A.; SALDIVA, P.H.; RESTREPO, L.E. AND CALICH, V.L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of host. **J. Leukoc. Biol**. 79: 1202-13, 2006.

138. POLLARD, A.M. AND LIPSCOMB, M.F. Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. **J. Exp. Med**. 172:159, 1990.

139. POPI, A.F.; LOPES, J.D. AND MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immun**. 218: 87-94, 2002.

140. PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J. & TRAVASSOS, L.A. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infec. Immun.**, 53: 199-206, 1986.

141. PUCCIA, R. & TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1610-1615, 1991.

142. QI, H.; DENNING, T.L. AND SOONG, L. Differential induction of interleukin-10 and interleulin-12 in dendritic cells by microbial Toll- like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infect. Immun.** 71: 3337-3342, 2003.

143. RE, F. AND STROMINGER, J.L. Toll-like receptor 2 (TLR 2) and TLR 4 differentially activate human dendritic cells. **J. Biol. Chem.** 276: 37692-37699, 2001.

144. REIS & SOUSA, C. Dendritic cells as sensor of infection. **Immunity**. 14: 495, 2001.

145. RESTREPO, M. A. The immunodiffusion technic in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia** 4(4):223-30, 1966.

146. RESTREPO, A. & MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel tests for the sorological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Appl. Microbiol.** , 28: 132-137, 1972.

147. RESTREPO, A. & MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Appl. Microbiol.,** 28: 138-144, 1974.

148. RESTREPO, A., SALAZAR, M.E., CANO, L.E., STOVER, E.P., FELDMAN, D., STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast

transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistence of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun**. 46:346-345, 1984.

149. RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis:* A Puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23: 323-324, 1985.

150. RESTREPO, A. Actualización sobre la paracoccidioidomycosis y su agente etiológico, 1986-1989. **Interciencia**. 15:193-199, 1990.

151. RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. AND CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medicam Mycology**. 39: 233-241, 2001.

152. ROGERS, N.C.; SLACK, E.C.; EDWARDS, A.D.; NOLTE, M.A.; SCHULZ, O.; SCHWEIGHOFFER, E.; WILLIAMS, D.L.; GORDON, S.; TYBULEWICZ, V.L.; BROWN, G.D. AND REIS E SOUSA, C. Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. **Immunity**. 22: 507-17, 2005.

153. SALAZAR M. E., RESTREPO A. & STEVANS D. A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.** 56: 711-713, 1988.

154. SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells in maintained by granulocytes macrophages colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulation by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, 179: 1109-1118, 1994.

155. SALLUSTO, F.; SCHAERLI, P.; LOETSCHER, P.; SCHANIEL, C.; LENING D.; MACKAY, C.R.; QUIN, S AND LANZAVECCHIA, A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol**. 28: 2760-2769, 1998.

156. SALLUSTO, F. AND LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. **J. Exp. Med**. 189: 611-614, 1999.

157. SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. Antigenic structure of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: E. KURSTAK (Ed.) **Immunology of Fungal Diseases**.171-192, 1989.

158. SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. AND ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol**. 40 (3), 225-42, 2002.

159. SCANGA, C.A. et al. MyD88 is requered for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J. Immunol**. 168: 5997-6001, 2002.

160. SCHILLING, J.D.; MARTIN, S.M.; HEING, C.S.; LORENZ, R.G. AND HULTGREN, S.J. Toll-like receptor 4 on stromal and hematopoietic cells mediates innate resistance to uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. 100: 4203-4208, 2003.

161. SEKI, E. et al. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflamatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. **J. Immunol**. 169: 3863-3868, 2002.

162. SHAHIN, R.D.; ENGBERG, I., HAGBERG, L. AND SVANBORG-EDEN, C. Neutrophil recruitment and bacterial clearence correlated with LPS responsiveness in local Gram-negaive infection. **J. Immunol**. 138: 3475-3480, 1987.

163. SHIBATA, Y.; METZGER, W.J. AND MYRVIK, Q.N. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose

receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. **J. Immunol**. 159: 2462-2467, 1997.

164. SHER, A. & COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **An. Rev. Immunol.,** 10: 385-398, 1992.

165. SHOME, S.K., BATISTA, A.C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Fed. Ceará**. 3:90-94, 1963.

166. SHORTMAN K., CAUX C. – Dendritic cell development: multiple pathways to natures adjuvants. **Stem Cells** 15 (6): 409-19, 1997.

167. SHORTMAN, K., WU, L. Parentage and heritage of dendritic cells. **Blood** 97:3325, 2001.

168. SILVA-VERGARA, M. & MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. 144:131-133, 1990.

169. SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G. & LEITE MAFFEI, C.M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol**., 36: 37-42, 1998.

170. SILVA-VERGARA, M., MARTINEZ, R., CAMARGO, Z.P., MALTA, M.H.B., MAFFEI, C.M. & CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypsus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol**. 38:193-99, 2000.

171. SMIT, J.J.; RUDD, B.D. AND LUKAS, N.W. Plasmocytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearence of respiratory syncytical virus. **J. Exp. Med**. 203: 1153-9, 2006.

172. SINGER, L. M. AND NETTO, C. F. Conglutinating complement fixation reaction in Sourth American blastomycosis. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo** 13(4):272-8, 1971.

173. SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; D'AMICO, G.; LUINI, W.; BIANCHI, G.; KATAURA, M.; IMAI, T.; TOSHIE, O.; BONECCHI, R. AND MANTOVANI, A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. **J. Immunol**. 161: 1083-1086, 1998.

174. SPLENDORE, A. Un'affezione micotica con localizzazion nella mucosa della bocca, osservada in Brasile, determinata da funghi appartenentialla tribú depli exoascei. (*Zimonema brasiliensis* n.s.p.) In: Volume in onore del Prof. Angelo Celli nel 25 anno di insegnamento. **Roma, G. Bertero**. 421-458, 1912.

175. STEFANOVA, I.; DORFMAN, J.R. AND GERMAIN, R.N. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naïve T lumphocytes. **Nature**. 420: 429-39, 2002.

176. STEINMAN, R. M., and COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. **J. Exp. Med**. 137-1142, 1973.

177. STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol**., 9: 271-296, 1991.

178. STUMBLES, P.A.; THOMAS, J.A.; PIMM, C.L.; LEE, P.T.; VENAILLE, T.J.; PROKSCH, S. AND HOLT, P.G. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. **J. Exp. Med**. 188:2019, 1998.

179. SUZUKI, N. et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. **Nature**. 416:750-756, 2002.

180. SVANBORG, C.; FRENDEUS, B.; GODALY, G.; HANG, L.; HEDLUND, M. AND WACHTTER, C. Toll-like receptor signalling and chemokine receptor expression influence the severity of urinary tract infection. **J. Infect. Dis**. 183 (suppl. 1), S61-S65, 2001.

181. TADA, H.; NEMOTO, E.; SHIMAUCHI, H.; WATANABE, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; OHNO, N.; TAMURA, H.; SHIBATA, T.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; SUGAWARA, S. AND TAKADA, H. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* derived mannan induced production of tumor necrosis factoe alpha by human monocytes in a CD14 and Toll-like receptor 4 dependent manner. **Microbiol. Immunol**. 46: 503-512, 2002.

182. TAKEUCHI O. et al. TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus* infection. **J. Immunol**. 165: 5392-5396, 2000.

183. TAYLOR, J.M. Molecular Phylogenetic classification of fungi. **Arch. Med.Res**., 26 (3), 307-14, 1995.

184. TAYLOR, P.R.; BROWN, G.D.; REID, D.M. et al. The beta-glucan receptor, dectin-1 predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol**. 169: 3876-3882, 2002.

185. TRINCHIERI G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv. Immunol**. 70: 83-243, 1998.

186. UENO, T.; SAITO, F.; GRAY, D.H.D.; KUSE, S.; HIESHIMA, K.; NAKANO, H.; KALIUCHI, T.; LIPP, M.; BOYD, R.L. AND TAKAHAMA, Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. **J. Exp. Med**. 200: 493-505, 2004.

187. UNANUE, E.R. & ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other acessory cells. **Science**, 236: 551-557, 1987.

188. UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.M.; STEVENS, A.; WILSON, C.B.; BASSETI, M. AND ADEREM, A. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between phatogens. **Nature**. 401:811, 1999.

189. UNDERHILL, D.M. AND OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Curr. Opin. Immunol**. 14: 103-110, 2002.

190. VAN DE GRAAF, C.A.A.; NETEA, M.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.M. AND KULLBERG, B.J. Differencial cytokine production and toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidea and hyphae. **Infect. Immun**. 73: 7458-7464, 2005.

191. VAN STRIPDONK, M.J.; HARDENBERG, G.; BIJKER, M.S.; LEMMENS, E.E.; DNOIN, N.M.; GREEN, D.R. AND SCHOENBERGER, S.P. Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. **Nat. Immunol**. 4: 361-5, 2003.

192. VERMAELEN, K.Y.; CARRO-MUINO, I.; LAMBRECHT, B.N. AND PAUWELS, R.A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. **J. Exp. Med**. 193:51, 2001.

193. VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L-; FRANCO, M.F.; DE SOUZA, W.; MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R. & LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun**., 62: 1465-1469, 1994.

194. WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; BREITTMAYER, J.; COTTREZ, F.; AND GROUX, H. Characterization of dendritic cells that

induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, 18:605-617, 2003.

195. WANG, T.; LAFUSE, W.P. AND ZWILLING, B.S. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Micobacterium avium* infection. **J. Immunol**. 6308-6313, 2000.

196. WANG, X.; MOSER, C.; LOUBOUTIN, J.P.; LYSENKO, E.S.; WEINER, D.J.; WEISER, J.N. AND WILSON, J.M. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. **J. Immunol**. 168: 810-815, 2002.

197. WANG, M.J.; JENG, K.C. AND PING, L.I. Exogenous cytokines modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hiporesponsive C3H/Hej mice with *Klebsiella* infection. **Immunology**. 98: 90-97, 1999.

198. WANKE, B. & LONDERO, A.T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis. *In*: Paracoccidioidomycosis (eds. M. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro), **CRC Press, Boca Raton, USA**, pp. 109-120, 1994.

199. WATANABE, K., KAGAYA, K., YAMADA, T., AND FUKAZAWA, Y. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant γ interferon. **Infect. Immun.** 59:521, 1991.

200. WICK, J.M. The role of dendritic cells in the immune response to *Salmonella*. **Immunology Letters**. 85:99-102, 2003.

201. WOODS, J.P.; FRELINGER, J.A.; WARRACK, G. AND CANNON, J.G. Mouse genetic locus LPS influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection. **Infect. Immun**. 56: 1950-1955, 1988.

202. YAMAMOTO, Y.; KLEIN, T.W. AND FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine-1 beta (IL-1 beta), IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. **Infect. Immun**. 65: 1077-1082, 1997.

203. YARZÁBAL, L. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicose sul americana revelados immunoelectroforesis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 13:320-327, 1971.

204. YARZÁBAL, L.A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J. & ANDRIEUS, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* resposible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**. 15: 79-85, 1977.

205. ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. 2 ed. New Jersey, Prentice Hall, p. 718, 1984.

ANEXO

Anexo

Artigo publicado: FERREIRA, KS; BASTOS, K; RUSSO, M AND ALMEIDA, SR. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with pulmonary dendritic cells induces IL-10 production and TLR-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **The Journal of Infectious Diseases**, 2007.

Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with pulmonary dendritic cells induces IL-10 production and TLR-2 expression: possible mechanisms of susceptibility

Karen Spadari Ferreira*; Karina Bastos#; Momtchilo Russo# and Sandro Rogerio Almeida*

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, #Departamento de Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Address correspondence to: Sandro Rogério Almeida – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo – Avenida Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 17 – São Paulo – Brazil – CEP: 05508-900
Phone: 55 11 3091-3633
FAX: 55 11 3813-2197
e-mail: sandroal@usp.br

Footnote: The authors do not have commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (research fellowships to M.R. and S.R.A. and a scholarship to K.S.F.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Abstract

An adaptive Th1-type immune response is required for protection against *Pb*. Knowing that DC are the most effective APCs for inducing cell-mediated immune responses, it is important to investigate lung DC and their potential to initiate an immune response in mice susceptible and resistant to PCM. Initially, we observed that lung DC from susceptible mice were more phagocytic than cells from resistant mice and we observed that phagocytosis in the presence of laminarin was inhibited only in DC from susceptible mice. Cytokines produced by DC from resistant mice showed a low concentration of IL-10, IL-12 and TNF-α. In contrast, DC from susceptible mice produced a high concentration of TNF-α and IL-10, but IL-10 production was significantly inhibited in the presence of laminarin. We also observed that DC from TLR-2KO mice presented a defective production of IL-10. We found that the gene expression for TLR2 is increased after infection in B10.A, but not in A/J mice. Thus, the capacity of lung DC from susceptible mice in inducing T cell activation was decreased. In conclusion, our data suggest that *Pb* induces regulatory DC in susceptible mice, which promotes IL-10 production contributing to the susceptibility of B10.A mice against *Pb* infection.

Key Words: Lung dendritic cell, PCM, T cell

Introduction

Infection with the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) can result in a granulomatous disease designated Paracoccidioidomycosis (PCM) that is prevalent in South America [1]. The infection starts with the inhalation of fungal propagules that undergo differentiation into yeast cells, which is the infective form of *Pb* [2]. It is known that clinical forms of *Pb* mycosis vary from a localized and benign disease to relentlessly progressive and potentially lethal systemic infections [3]. This broad spectrum of clinical forms is a result of the role that several factors such as the host responses and virulence of the infecting agent play in determining the severity of the disease [4-8].

It was previously shown that polar forms of the disease could be reproduced in mice. When used as hosts for infection, the B10.A mouse strain was found to be susceptible whilst the A/J strain was extremely resistant to *Pb* infection. When infected with *Pb*, A/J mice exhibit a limited number of well-organized granulomatous lesions that evolve to spontaneous resolution. In contrast, B10.A mice display numerous non-organized inflammatory lesions that contain many viable yeast cells and a cellular infiltrate rich in plasma cells [9].

The mechanisms involved in resistance to *Pb* infection are poorly understood, but it is likely that dendritic cells (DC) play a pivotal role in the induction of effector T cells that control *Pb* infection. Indeed, IFN-γ and IL-10 production appear to be involved in the resolution or dissemination of PCM in mice and humans (10, 11)

The immune system has evolved an elaborate system of pathogen surveillance, the so-called pathogen-recognition receptors (PRRs), which can recognize conserved structures in microbes [12]. The novel classes of PRRs are the Toll-Like receptors (TLRs) [13]. During the past few years, extensive research has demonstrated that TLRs are crucial for the recognition of pathogenic microorganisms and activation of innate immune response [14]. Recent studies have demonstrated an involvement of TLRs in the recognition of fungal pathogens such as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Cryptococcus neoformans* [15-17].

DC are antigen-presenting cells that act as sentinels in the peripheral tissues, constantly sampling the antigens in their environment. Recently, it has been shown that triggering different TLRs on DC results in distinct programs of gene expression

and cytokine secretion that differentially regulate the type of adaptive immune response [18]. It was shown that lung DC play a pivotal role in infections caused airborne pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus* and *Cryptococcus neoformans* [19-21].

We have recently shown that *Pb* inhibits the maturation of bone-marrow-derived DC, but little has been learned about the role of DC in the initial interaction with the organism in the lung [22].

Because DC are the most effective APC for inducing cell-mediated immune responses, it is important to investigate lung DC and their potential to initiate an immune response. In the present study, we analyzed the role that lung dendritc cells played in the experimental infection with *Pb*. Our results indicate that *Pb* induces regulatory DC in susceptible mice, which secreted IL-10 in abundance. Furthermore, regulatory DC appear to be induced via the activation of TLR-2 and dectin-1 receptors, which promotes the production of IL-10 and induces impaired T cell response contributing to the susceptibility of B10.A mice against *Pb* infection.

Material and Methods

Animals

For this study, we used 8 to 12-weeks-old female mice belonging to strains B10.A (mice susceptible to PCM), A/J (mice resistant to PCM), C57Bl/6 and TLR2 KO C57Bl/6, all obtained from the animal laboratory of the University of São Paulo.

P. brasiliensis strains

The yeast form of highly virulent *P. brasiliensis* strain 18 grown in Sabouraud-agar was used for the infection assays and for preparation of the fungal antigen.

P. brasiliensis antigen- "Cell-free antigen" (CFA)

P. brasiliensis strain 18 was grown on Sabouraud-agar at 35°C for 3 days. The cell mass was suspended in 1 ml of RPMI, mixed for 30s in a Vortex mixer, and immediately centrifuged for 60s. The resulting supernatant contained the antigen (CFA) [23]. The protein concentration in CFA was determined according to Bradford [24].

DC isolation

DC were isolated from lungs as described previously [25]. After perfusing the pulmonary vasculature with 5ml of PBS containing 100 U/ml heparin, the lungs were minced and incubated for 90 min at 37°C in digestion buffer containing 0.7 mg/ml collagenase IV (Sigma-Aldrich) and 30 mg/ml type IV bovine pancreatic DNase I (Sigma-Aldrich). Large particulate matter was removed by passing the cell suspension through a small loose nylon wool plug. After exposing to plastic over-night in order to remove macrophages by adherence, DC were incubated with 100 μg of MicroBeads (Miltenyi Biotec) conjugated to hamster anti-mouse CD11c mAbs. Positively selected DC contained > 90% $CD11c^{high}$.

Phagocytosis test

For the phagocytosis test, lung DC were cultured over round glass coverslips in 24-well plates and incubated with yeast at a yeast-to-cell ratio of 3:1 during 4 h at 37°C. The glass coverslips were rinsed with PBS for removal of non-internalized *Pb* cells and stained by Giemsa. A mean of 200 DC were counted to determine the phagocytic indices (PI), calculated as the percentage of phagocytic cells in relation to the total number of cells multiplied by the mean number of internalized particles. For the inhibition assays, lung DC were previously incubated for 30 min with 100 μg/ml of α-mannan obtained from *Sacharomyces cerevisae* (Sigma) or 100 μg/ml of laminarin (Sigma) before adding the *Pb* yeast cells.

Analysis of lung DC phenotype and cytokine production

The effects of *Pb* on surface molecule expression in lung DC were investigated using DC incubated with yeast (at a ratio of 3:1) for 24 h. The phenotype of the DC was analyzed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson). In order to determine the expression of class II MHC and co-stimulatory molecules, we used PE-labeled Mabs against mouse $I\text{-}A^k$ (11-5.2), CD80 (16-10A1), CD40, CD54 and CD86 (GL1). Supernatants from cultures were assayed for IL-12, IL-10, TNF-α and IL-6 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Pharmingen).

Mouse infection

Mice were challenged with an intratracheal inoculation of $1x10^6$ yeast cells of the virulent *Pb* strain 18 and after 1, 2, 4 and 15 days, the lungs were removed and DC were purified as described above. Purified DC were cultured for 24 hrs and the supernatant was used to determine cytokines. In order to determine cell surface markers, purified DC were incubated with anti-CD80, anti-CD86, anti-CD54 and anti-MHC-II and analyzed by flow cytometry.

Transmission electron microscopy

Six hours after intratracheal inoculation with *Pb* as describe above, lung DC were purified and fixed overnight with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (ph 7.2) at 4°C, rinsed three times with PBS and post-fixed with 2% osmium tetraoxide for 2h. Samples were then dehydrated in ethanol at increasing concentrations (25% to 100%, v/v), air dried and coated with gold (12 nm). The samples were viewed on a GOL X-100 electron microscope.

TLR2, TLR4 and MyD88 mRNA analysis

Mice were challenged by intratacheal inoculation with $1x10^6$ yeast forms of the virulent *Pb* strain 18 and after 24 hr lungs were removed and DC were purified as described above. The transcription of mRNA was detected by RT-PCR. Total RNA from lung dendritic cells was extracted using the commercial kit TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA - USA), according to the manufacturer's instructions. The first strand of cDNA was synthesized from 1µg of total RNA by using Superscript II RNAase H-reverse Transcriptase, following the manufacturer's instructions with 0.5 µg of Oligo $(dT)_{12-18}$ (Invitrogen, Life Technologies). One-tenth of the cDNA synthesized was amplified by PCR using 0.33µM sense and anti-sense primers (Invitrogen Brasil, Life Technologies, SP - Brazil) with Platinum mix (Invitrogen, Life Technologies) with 1.5U of *Taq* polymerase and 2.5 mM $MgCl_2$ in a final volume of 30µl. PCR cycles were performed for 1 min at 94°C for denaturation, 1min30sec at 62°C for annealing; 1min at 72°C for extension and at the first cycle, denaturation was run for 3 min at 94°C. The sequence of the sense and anti-sense primers, the size of products, and PCR cycles are as follows: **HPGRT**: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3' and 5'-GAG GGT AGG CTG GCC TAT GGC T-3'; **TLR2**: 5'-ACA GCT TAC TGT GAC TCT CCG CC-3' and 5'-GGT CTT GGT GTT ATT ATC TTG CGC-3' **TLR4:** 5'-GAC CTC AGC TTC AAT GGT GC-3' and 5'-TAT CAG AAA TGC TAC

AGT GGA TAC C-3'; **MyD88**: 5'-CAC CTG TGT CTG GTC CAT T-3" and 5'-CGC AGG ATA CTG GGA AAG T-3'. A 10 µl sample of each PCR product was submitted to electrophoresis in a 1.4 % agarose gel. After staining with ethidium bromide (Sigma), PCR products were visualized by UV transillumination.

T-cell activation

Lung DC isolated from naïve or infected mice for 15 days were incubated with *P.brasiliensis*-specific T $CD4^+$ cells. $CD4^+$ T cells from mice immunized for 7 days with *Pb* antigen were purified from draining popliteal and brachial lymph nodes by positive selection using anti-CD4 MACS magnetic beads (Miltenyi Biotec) Lung DC (5 $x10^5$ cells) and $CD4^+$ T (2 x 10^6 cells) cells were incubated for 72 h in the presence or absence of *Pb* antigen and then pulsed for 16h with [^{3}H]-labeled Thymidine (1 µCi/ml). Cells were collected with an automated cell harvester, and incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation counts per minute of [^{3}H] Thymidine incorporation.

Results

***In vitro* phagocytosis of *P. brasiliensis* by lung dendritic cells**

In order to determine whether lung dendritc cells would phagocytose yeast forms of *Pb in vitro*, purified dendritic cells obtained from the lung of resistant and susceptible mice were exposed to the fungus and the phagocytic index was determined. We observed that lung DC were able to phagocytose *P b*. However, DC from susceptible mice were more phagocytic than dendritic cells from resistant mice (Fig. 1A).

Next, we evaluated the importance of carbohydrate receptors in this process. We observed that in the presence of mannan, phagocytosis was inhibited in cells purified from both mouse strains (Fig. 1B). In contrast, in the presence of laminarin phagocytosis was inhibited only with cells obtained from susceptible mice (Fig. 1C).

Production of cytokine and expression of co-stimulatory molecules by lung DC exposed to *P. brasiliensis in vitro*

In order to assess the pattern of cytokine production and expression of co-stimulatory molecules by DC upon phagocytosis of the fungus, purified DC from lungs of resistant and susceptible mice were exposed to the fungus for 24 h and cytokines were determined by ELISA whereas expression of co-stimulatory molecules was done so by flow cytometry. We observed that in the presence of the fungus, DC from resistant mice produced a low level of cytokine, where only IL-10 was detected (Fig. 2A). However, DC from susceptible mice produced a high concentration of TNF-α and IL-10 (Figs. 2A and 2B). IL-12 was detected only at basal levels in cells from both strains of mice (Fig. 2C). There is extensive evidence that glucan, the major component of the fungal cell wall, is recognized by dectin-1 in conjunction with TLR2 in DC, leading to the induction of IL-10 production. Therefore, we then blocked dectin-1 receptors in DC with laminarin and IL-10 production was analyzed. We observed that in the presence of laminarin, IL-10 production by DC obtained from B10.A mice was significantly inhibited (Fig. 2D). No difference was observed in DC obtained from A/J mice. Using lung DC from TLR2-KO mice, that present an intermediate pattern of susceptibility to PCM (C57Bl/6), we detected a low level of IL-10 production in the presence of *Pb* (Fig. 2E).

The analyses of co-stimulatory molecules showed an increase of expression in CD54 and CD80 in cells from susceptible mice and CD80 in cells from resistant mice (Fig. 2F).

***In vivo* uptake of *P. brasiliensis* by lung DC**

To assess whether *Pb* was internalized *in vivo*, mice were infected with yeast cell forms of the fungus and after 6 h lung DC were purified and analyzed by transmission electron microscopy. We observed that lung DC from both strains of mice were able to internalize *Pb in vivo* (Fig. 3).

Expression of TRL2, TLR4 and MyD88 by lung DC after intratacheal infection with *P. brasiliensis*

There has been evidence that triggering different TLRs on DC results in distinct programs of gene expression and cytokine secretion that differentially regulate the type of adaptive immune response. Therefore, we compared the expression of TLR2, TLR4 and MyD88 between lung DC from resistant and susceptible mice after 24 h of infection. We observed that only DC from susceptible mice expressed TLR2 after infection. On the other hand, TLR4 and MyD88 were expressed by cells from both strains of mice (Fig. 4). To determine whether the

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

inability of expressing TLR2 was intrinsic to lung dendritic cells from A/J mice, we carried out an experiment using peritoneal macrophages. We observed that macrophages from naïve A/J mice express TLR2 (data not shown).

Expression of co-stimulatory molecules and cytokine production in dendritic cells during pulmonary infection

After infection or appropriated stimulus, the maturation of DC is characterized by the up-regulation of MHC-II and co-stimulatory molecules. In view of this, we examined and compared the levels of surface molecules on lung DC during a *Pb* infection. The kinetics of expression during infection was different when B.10A and A/J mice were compared. Susceptible mice express high levels of CD86, CD80 and CD54 on the first and second days of infection, but this level was found to be decreased after 15 days following infection. On the other hand, DC from resistant mice expressed low levels of CD86, CD80 and CD54 in the beginning of infection and the increased after 15 days following infection. The level of MHC-II increased throughout the infection in cells from both strains of mice (Fig. 5).

Determination of cytokines showed that DC purified from resistant mice produced high levels of TNF-α and IL-6 after 4 days of infection. In contrast, the production of TNF-α and IL-6 by DC from B10.A mice was high after 2 days of infection and decreased after 4 days. When IL-10 was determined, a relevant difference was observed between resistant and susceptible mice. DC from susceptible mice produced a high concentration of IL-10 when compared with resistant mice and this production increased throughout the infection. IL-12 was only detected in its basal concentration in both strains of mice (Fig. 6).

***P. brasiliensis*-specific T cell activation by lung DC after pulmonary infection**

Here we tried to determine whether lung DC from infected animals could present *Pb* antigens to T cells. First, we showed that lung naïve DC from both strains of mice were able to induces T cell activation (Before Infection, Fig. 7). However, DC from susceptible mice lost the capacity to induce T cell activation after 15 days of infection. In contrast, we observed that DC from resistant mice induced T cell proliferation efficiently (After Infection, Fig. 7).

Discussion

The mechanisms underlying resistance or susceptibility to paracoccidioidomycosis (PCM) are not yet clear. Several investigators have suggested that progressive disseminated forms of PCM in humans are associated with various degrees of suppressed cell-mediated immunity [26]. This anergy can be reversed after successful therapy, when normal levels of T cell function are partially or completely restored [27]

PCM starts with inhalation of the fungus, thus, lung cells such as DC are in the first line of defense against this microorganism. Therefore, we postulated that lung DC are important for the phagocytosis of *Pb* and presentation of *Pb* antigens to T cells. Accordingly, in this study, we examined phagocytosis of *Pb in vitro* and *in vivo*, lung DC maturation and cytokine production, and *ex vivo* T cell-activation of cells obtained from mice susceptible and resistant to PCM.

First, we analyzed if lung DC were able to phagocytose yeast cells of *Pb in vitro*. We observed that DC from susceptible mice were more phagocytic than cells from resistant mice. Authors have shown that carbohydrates present on the cell wall of fungi are import for their interaction with DC in the innate immune response [28]. We observed that phagocytosis in the presence of mannan was inhibited in cells obtained from both strains of mice, but laminarin was inhibitory only to DC from susceptible mice. This result could explain, at least in part, the high phagocitosis index observed for DC in cells obtained from susceptible mice. Probably, the fungus could be phagocyted via mannose and detectin-1 receptors.

Cytokines produced by DC are important for the induction of the inflammatory signal and stimulation of naïve T cells. Our results showed that DC from resistant mice produced a low concentration of IL-10, IL-12 and TNF-α. In contrast, DC from susceptible mice produced a high concentration of TNF-α and IL-10. This result shows that binding to different receptors on DC from susceptible mice could lead to specific profiles of cytokine production. Authors have shown that binding to a detectin-1 receptor in conjunction with TLR-2 could induce the production of IL-10 [29]. Therefore, we chose to evaluate the production of IL-10 in DC obtained from B10.A mice in the presence of laminarin. We observed that IL-10 production was

significantly inhibited in the presence of laminarin, demonstrating that binding of β-glucan with detectin-1 receptors induces IL-10 production in DC from susceptible mice. We also observed that TLR-2 is involved in IL-10 production by lung DC, since DC from C57BL/6 TLR-2KO mice presented a defective production of IL-10.

Efficient T cell activation by DC is dependent on the up-regulation of MHC and co-stimulatory molecules. We observed *in vitro* that in the presence of *Pb,* DC from resistant mice increased their expression of CD80 molecules, however, expression of MHC-II, CD86 and CD54 remained unaltered. in contrast, cells obtained from susceptible mice increased their expression of CD80 and CD54.

In the next phase of our experiment, we analyzed if DC were able to phagocytose *Pb in vivo*. The results showed that lung DC phagocytose *Pb* 6 h after intratracheal infection. In similar studies involving other pathogens that have the ability of infecting lung tissue, such as *M. tuberculosis* [19] and *A. fumigatus* [20], lung DC have been shown to phagocytose the organisms *in vivo* and are responsible for initiating an adaptive immune response. Thus, we analyzed the kinetics of expression of co-stimulatory molecules and cytokine production in lung DC after infection. We observed that DC obtained from resistant mice expressed a low level of co-stimulatory molecules and cytokine production in the first and second days following infection, however, after 4 days the concentrations of these molecules and cytokine production became increased. In contrast, in DC from susceptible mice, the expression of co-stimulatory molecules and cytokine production was found to be high in the beginning of infection and decreased after 4 days. The production of IL-10 by DC from susceptible mice was high and this cytokine was found to be increased after 15 days of infection. This cytokine has inhibitory properties in the PCM model [9].

The evidence that lung DC, through the production of IL-10, mediate unresponsiveness to respiratory Ags [30] indicates that local production of immunregulatory cytokines may affect the ability of DC to instruct T cells as to the appropriate responses against the invading pathogens. In normal circumstances, a state of tolerance to inhaled Ags is achieved through several mechanisms including IL-10 production by local DCs [31].

Besides surface co-stimulatory molecules, DC also expresses TLR that play an important role in pathogen identification and immune regulation. In the present study, we found that the expression of the gene for TLR2 is increased after infection

in B10.A mice, but not in A/J mice. The expression of TLR2 in DC from susceptible mice could be responsible for the high levels of IL-10 observed. Our *in vitro* experiment corroborates these results, where we observed that IL-10 production was low in DC from TLR2KO mice were incubated with *Pb*. We also observed that TLR4 was increased in both strains of mice after infection. Similarly, MyD88 was also expressed in both strains of mice.

Yersinia enterocolitica and *Candida albicans* have been shown to exploit TLR-2-mediated IL-10 release to induce immunosupression [32, 33]. In the case of *C. albicans* infection, this effect is attained through generation of $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory cells. Lack of TLR-2 in knockout mice renders them resistant to lethal *Yersinia* and *Candida* infections. Similarly, *A. fumigattus* also evade immune recognition during germination through TLR-2-mediated IL-10 production [34].

Finally, we examined the potential of pulmonary DC from infected mice in presenting antigens to *Paracoccidioides*-specific T cells *ex vivo*. We showed that DC from resistant mice were able to activate T cells. However, DC from susceptible mice did not induce T cell activation.

In conclusion, our data suggest that *Pb* induces regulatory DC in susceptible mice, which secrete IL-10 in abundance, but little or no IL-12, inducing an impaired T cell response. Such regulatory DC appear to be induced via activation of TLR-2 and dectin-1 receptors, which promotes IL-10 production to down-modulate the host's microbicidal activity, thus contributing to the susceptibility of B10.A mice against *Pb* infection.

Acknowledgements: This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Process: 03/12816-3) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico).

Legends of Figures

Figure 1: Phagocytic index. Lung dendritic cell were purified from naïve susceptible (B10A) or resistant (A/J) mice and co-cultured with *P. brasiliensis* (parasite-to-cell ratio, 3:1) for 4 h and stained with Giemsa stain (1A). Effect of mannan (B) or laminarin (C) on internalization of *P. brasiliensis* by dendritic cells. Dendritic cells were incubated with mannan or laminarin at 100μg/ml for 30 min before the addition

of *P. brasiliensis* at ratio of 3:1 (yeast/dendritic cells). Internalized fungal cells were visualized by light microscopy after 4 h of incubation to determine the Phagocytic index. The results are representative of three independent experiments.

*$p<0.05$ as compared with dendritic cells cultivated without treatment.

#*$p<0.05$ as compared with dendritic cells from A/J mice

Figure 2: Influence of *P. brasiliesnis* on the release of IL-10 (A) and TNF-α (B) and IL-12 (C) by lung dendritic cells. After 24 h the supernatants were harvested, then IL-10, TNF-α and IL-12 quantified by ELISA. **2D:** Influence of laminarin on the release IL-10 by lung dendritic cells from susceptible mice B10A. Dendritic cells were incubated with laminarin at 100μg/ml for 30 min before the addition of *P. brasiliensis* at ratio of 3:1 (yeast/dendritic cells) and after 24 h the supernatant was harvested and IL-10 quantified. **2E:** Influence of TLR2 on the release IL-10 by lung dendritic cells. Lung dendritic cells were purified from TLR2 KO and WT mice and incubated with *P. brasiliensis* at ratio of 3:1 (yeast/dendritic cells) and after 24 h the supernatant was harvested and IL-10 quantified. **2F:** Flow cytometry of expression of MHCII, CD80, CD86 and CD54 of lung dendritic cells from A/J and B10A mice in presence or absence of *P. brasiliensis*. Data are displayed as a means of fluorescence intensity (MFI) obtained with specific mAbs. Results are representative of three independent experiments.

*$p<0.05$ as compared with dendritic cells cultivated without *Pb* or treatment

Figure 3: Electronic microscopy of *P. brasiliensis*-infected lung dendritic cells after 6 hr of infection showing yeast inside of dendritc cells from A/J (A) and B10A (B) mice (black arrows).

Figure 4: TLR2, TLR4 and MyD88 expression in lung dendritc cells after *P. brasiliensis* infection . A/J and B10A mice were challenged by intratacheal inoculation of $1x10^6$ yeast forms of the virulent *Pb* strain 18 and after 24 hr lungs were removed and DCs were purified. The expression of TLR2, TLR4 and MyD88 in lung dendritic cells were assessed. The expression of HPGRT was evaluated as a control. C: Represent animals challenged with PBS (control) and I: Represent

animals challenged with *P. brasiliensis*. The results are representative of three independent experiments.

Figure 5: Lung dendritic cells kinetic of co-stimulatory molecules expression during infection with *P. brasiliensis*. A/J and B10A mice were challenged by intratacheal inoculation of $1x10^6$ yeast forms of the virulent *Pb* strain 18 and after 1, 2, 4 and 15 days DC were purified and means of fluorescence intensity (MFI) obtained with specific mAbs. The horizontal dotted lane denote mean of MFI of lung dendritic cells from non-infected B10.A mice. The horizontal continued lane denote mean of MFI of lung dendritic cells from non-infected A/J mice. The results are representative of three independent experiments.

Figure 6: Lung dendritic cells kinetic of cytokine production during infection with *P. brasiliensis*. A/J and B10A mice were challenged by intratacheal inoculation of $1x10^6$ yeast forms of the virulent *Pb* strain 18 and after 1, 2, 4 and 15 days DC were purified and cultured by 24 hr. After 24 hr the supernatant was harvested and cytokine determined. Controls represent the mean of cytokine production by lung dendritic cells from non-immunized mice. The results are representative of three independent experiments.

Figure 7: Proliferation of *P. brasiliensis*-specific T cells in response to ex vivo stimulation by lung dendritic cells from infected (After Infection) or not infected (Before Infection) mice. Mice were not challenged (naïve) or were inoculated with *P. brasiliensis*. At 15 days post-inoculation, mice were sacrificed and lung dendritic cells purified. Dendritic cells were then incubated with purified CD4+T cells specific for P. *brasiliensis* in different concentrations of Ag (CFA). Proliferative response was determined 72 h later in a [^{3}H] thymidine incorporation assay. The results are representative of three independent experiments and are expressed as arithmetic means$\pm$ SD.

References

1. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol **1986**; 25: 5-18.

2. Giraldo R, Restrepo A, Gutierrez F, Robledo M, Londono F, Hernandez H, Sierra F, Calle G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. Mycopathologia **1976**; 58: 63-70.

3.San Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol **1993**; 31:99-113.

4.Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques AS, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop **1987** 20:129-32.

5. Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Ver **1993;** 6:89-117.

6. Biagione L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Maques SA, Mota NGS, Franco MF. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. Trans R Soc Trop Med Hyg **1984**; 78:617-21.

7. Musatti CC, Rezkallah-Iwasso MT, Mendes E, Mendes N. *In vivo and in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with Paracoccidioidomycosis. Cell Immunol **1976**; 24:365-78.

8. Mota NGS, Iwasso MTR, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques SA, Dillon NL, Franco M. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. Trans R Soc Trop Med Hyg **1985;** 79:765-72.

9. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol **1985;** 66:585-94.

10. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect Immun **1998;** 66:800-06.

11. 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: 615-23.

12. Shortman K, Lui YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol **2002**; 2:151-61.

13. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. Semin Immunol **2004**; 16: 23-6.

14. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr Opin Immunol **2003**; 15:396-401.

15. Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O´Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine difenses against *Candida albicans* infections. Microbes Infect **2004**; 6:1-7.

16. Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latge J-P, Michan A, Loeffler J, Haddad Z, Grigoleit U, Schil H, Hebart H. *Aspergillus fumigatus* antigens active innate immune cells via Toll-like receptors 2 and 4. Br J Haematol **2004**; 125:392-99.

17. Shoham S, Huang C, Chen J-M, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. J Immunol **2001**; 166:4620-25.

18. Manickasingham SP, Edwards AD, Schulz O, Reis e Sousa C. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. Eur J Immunol **2003**; 33:101-07.

19. Peters W, Cyster JG, Mack M, Schlondorff D, Wolf AJ, Ernst JD, Charo IF. CCR2-dependent trafficking of F4/80 (dim) macrophages and CD11c (dim/intermediate) dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis.* J Immunol **2004**; 172:7647-53.

20. Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, Romani L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus funigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. J Immunol **2002**; 168:1362-71.

21. Wozniak KL, Vyas MJ, Levitz SM. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. Infect Immun **2006**; 74:3817-24.

22. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis.* Immunol Letters **2004;** 94:107-114.

23. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy S, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol **1988;** 26:2147-51.

24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein resing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **1976;** 72:248-59.

25. Gonzales-Juarrero M, Orme MI. Characterization of murine lung dendritic cell infected with *Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun **2001;** 69:1127-33.

26. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression inparacoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis **1997**; 175:1263-7.

27. Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg **1996**; 54:7-12.

28. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β-glucans. J Exp Med **2003**; 197:1119-24.

29.Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. J Leuk Biol **2004**; 75:749-55.

30. Akbari O, Dekruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nat Immunol **2001**; 2:725-31.

31. Xia W, Pinto CE, Kradin RL. The antigen-presenting activities of Ia dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after airway challenge with soluble antigen. J Exp Med **1995**; 181:1275-83.

32. Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Widemann A, Kirschning CJ, Aefelbacher M, Heesemann J. *Yersinia* V-antigen exploits Toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin-10-mediated immunosuppression. J Exp Med **2002**; 196:1017-24.

33. Netea MG, Sutmuller R, Hermann C, Van der Graaf CAA, Van der Meer JWM, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 inhibits cellular responses against *Candida albicans* through pathways mediated by IL-10 and CD4+CD25+ regulatory T cells. Eur Cytokine Netw 14 (suppl.), 116 (abstract) **2003**.

34. Netea MG, Warris A, Van der Meer JWM, Fenton MJ, Jacobs L, Verver-Jansen T Andressen T, Verweij P, Kullberg BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of TLR4-mediated signal transduction. J Infect Dis **2003**; 188:320-26.

Figures:

Figure 1

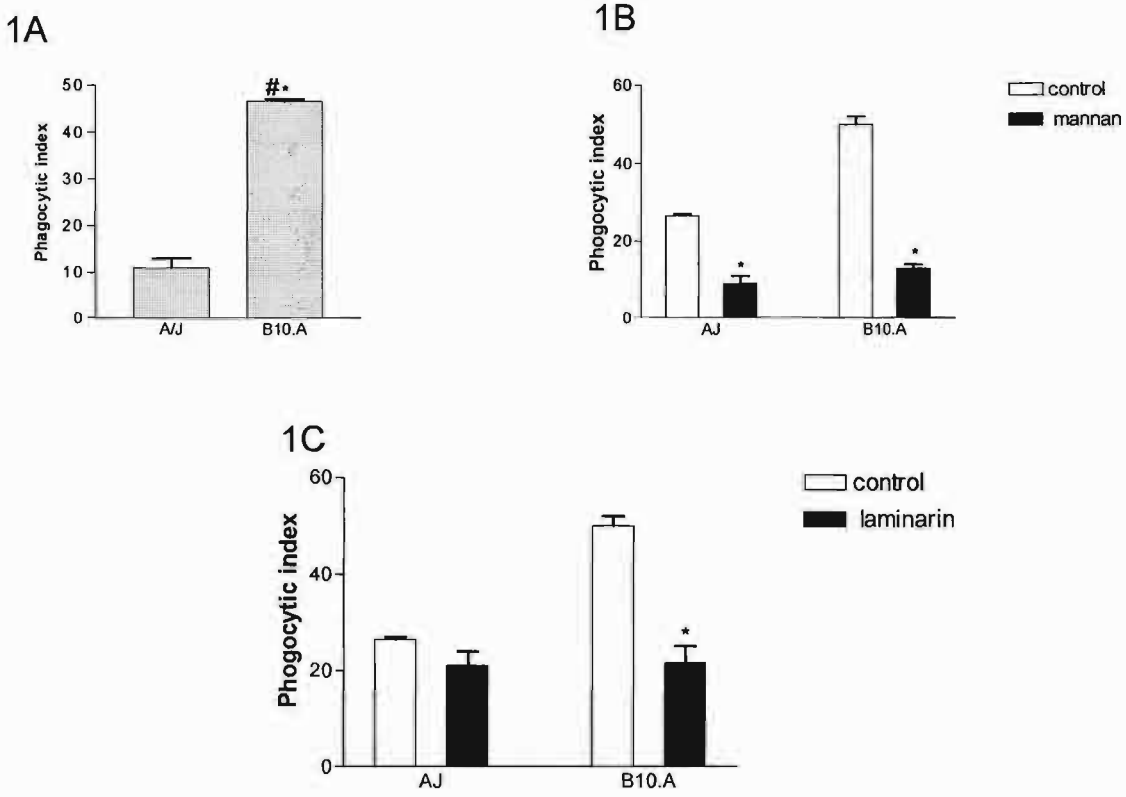


Figure 2

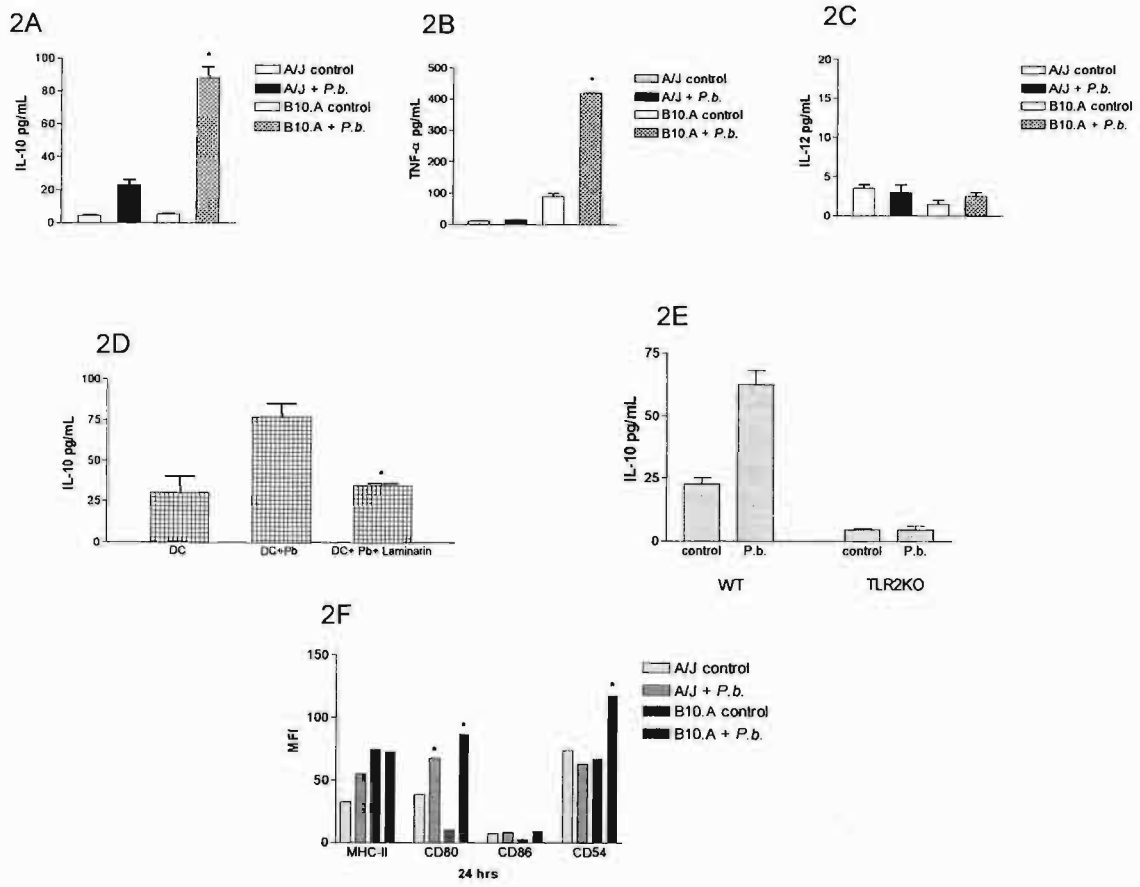


Figure 3

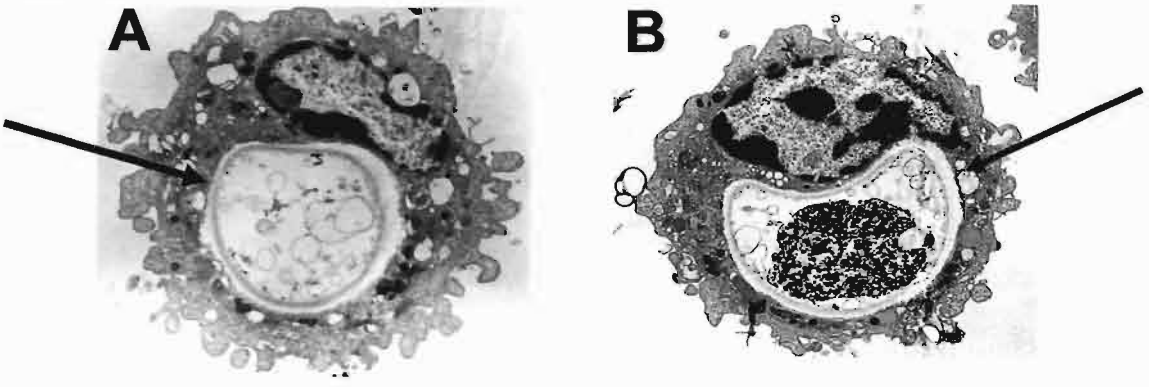


Figure 4

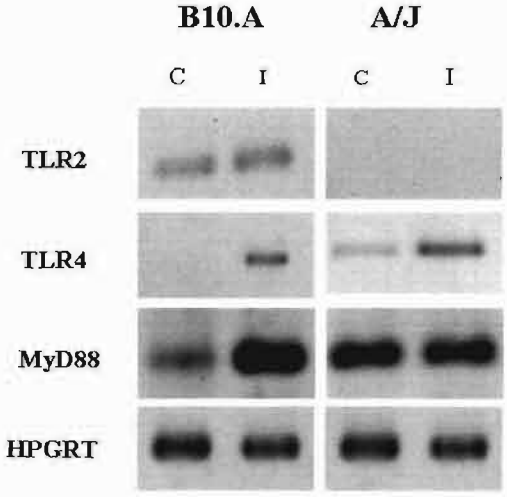


Figure 5

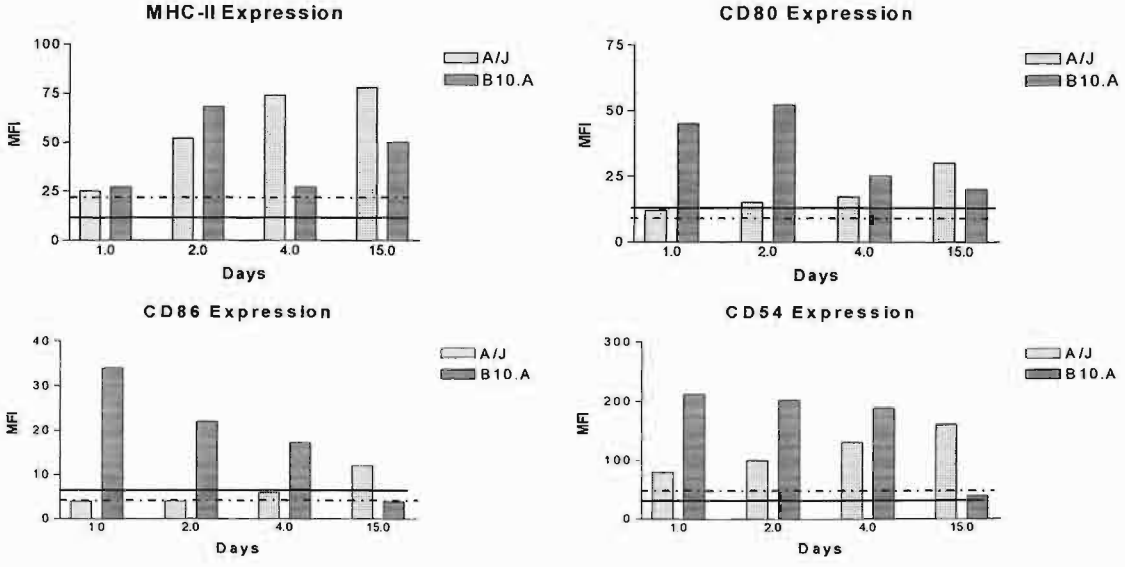


Figure 6

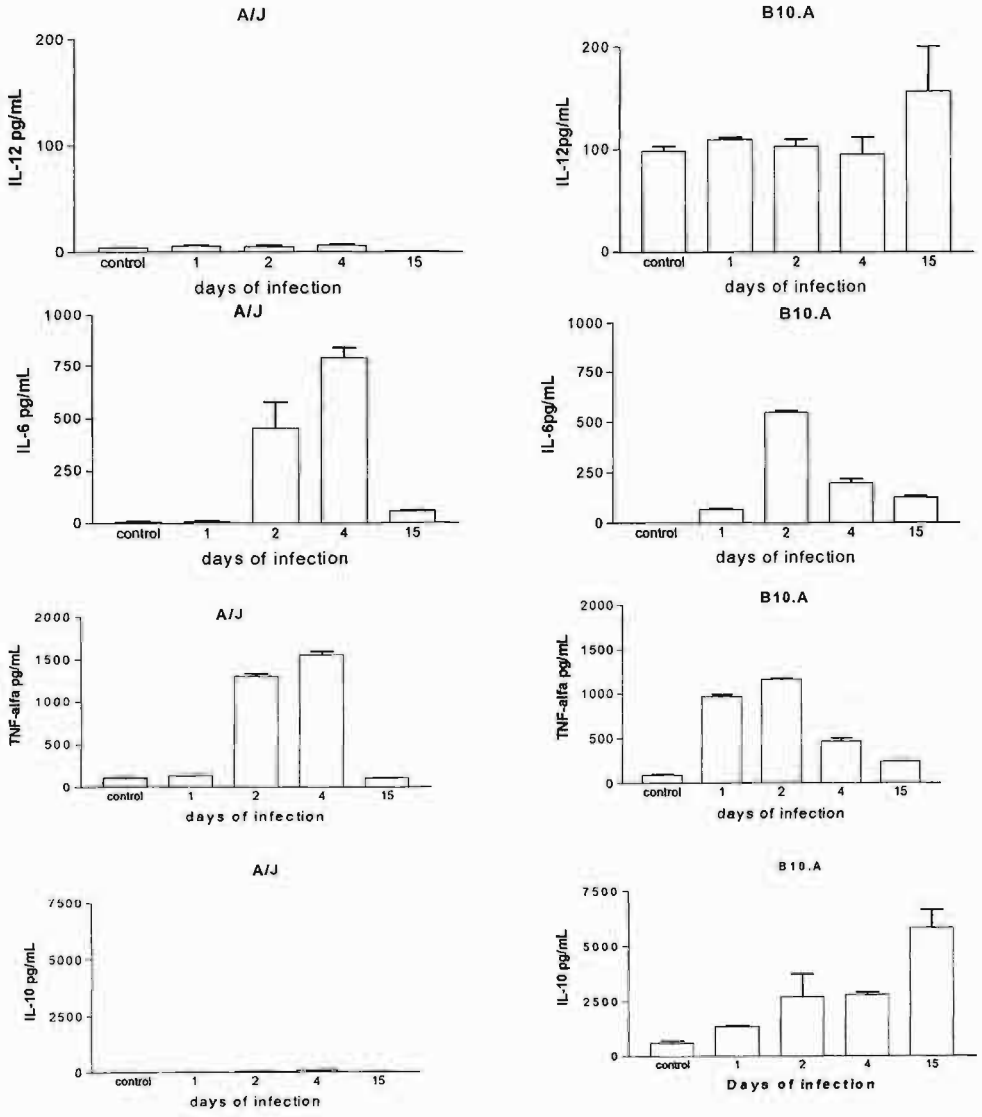
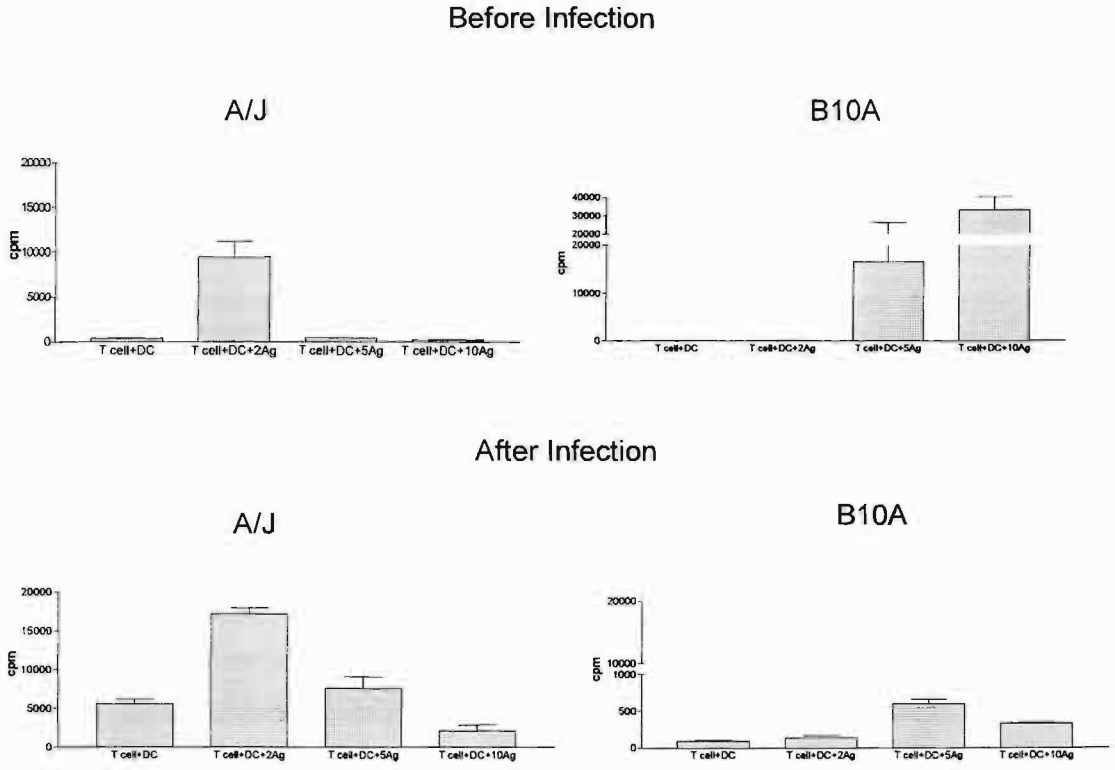

A/J
IL-12 pg/mL
200
100
0
control
1
2
4
15
days of infection
B10.A
IL-12pg/mL
200
100
0
control
1
2
4
15
days of infection
A/J
IL-6 pg/mL
1000
750
500
250
0
control
1
2
4
15
days of infection
B10.A
IL-6pg/mL
1000
750
500
250
0
control
1
2
4
15
days of infection
A/J
TNF-alfa pg/mL
2000
1500
1000
500
0
control
1
2
4
15
days of infection
B10.A
TNF-alfa pg/mL
2000
1500
1000
500
0
control
1
2
4
15
days of infection
A/J
IL-10 pg/mL
7500
5000
2500
0
control
1
2
4
15
days of infection
B10.A
IL-10 pg/mL
7500
5000
2500
0
control
1
2
4
15
Days of infection

Figure 7


Before Infection
A/J
B10A
cpm
20000
15000
10000
5000
0
T cell+DC
T cell+DC+2Ag
T cell+DC+5Ag
T cell+DC+10Ag
40000
30000
20000
20000
10000
0
After Infection
A/J
B10A
20000
15000
10000
5000
0
10000
1000
500
0

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of.CEEA nº 14/2004

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Estudo de células dendríticas pulmonares na paracoccidioidomicose experimental**" (Protocolo nº36), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Karen Spadari Ferreira** e do orientador(a) Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 05/04/2004.*

São Paulo, 06 de abril de 2004.

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 30913677 / Fax: (11) 3031-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br