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

Análise da capacidade migratória e da ativação de linfócitos
T CD4+ por células dendríticas na paracoccidioidomicose
experimental

Suelen Silvana dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2010

Suelen Silvana dos Santos

Análise da capacidade migratória e da ativação de linfócitos
T CD4+ por células dendríticas na paracoccidioidomicose
experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Sandro Rogério de Almeida
Orientador/presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, agosto de 2010

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Heleni e Waldomiro,
pelo seu grande incentivo, dedicação e amor.*

À minha família...

À minha mãe que nunca mediu esforços para ver meus sonhos se tornarem realidade, que confiou na minha capacidade de progredir, de avançar, e que esteve do meu lado durante toda essa jornada. Que me ouviu longas horas no telefone em várias ligações diárias, minhas reclamações e conquistas.

Ao meu pai, que com seu jeito mais calado quando o assunto é elogiar, mostrou se orgulhar de mim de diferentes formas, comemorando comigo as conquistas.

Às minhas irmãs Silvia e Taís que foram minha segunda mãe, ajudaram na minha educação, cuidaram de mim enquanto criança e foram meus exemplos como pessoa e profissionais.

Ao meu irmão Marcos Vinícius, que para mim vai ser sempre o irmãozinho que eu tanto sonhei em ter, meu orgulho, um menino com muito caráter e simplicidade.

Aos meus sobrinhos, que me mostraram como é bom ser tia, ser madrinha, um amor realmente incondicional.

Aos tios, tias, primos e primas, dos quais eu sinto muita falta aqui nessa cidade, falta das festas em família, das palhaçadas em família, que sempre fizeram qualquer almoço para um reencontro virar um grande evento.

À minha avô Maria (*in memoriam*) pelo seu exemplo de força, mesmo tendo passado pelas maiores dificuldades, sempre foi guerreira, e sempre teve um sorriso no rosto, um conselho bom..."Maria, Maria/ Mistura a dor e a alegria Mas é preciso ter manha/ É preciso ter graça/ É preciso ter sonho sempre Quem traz na pele essa marca /Possui a estranha mania De ter fé na vida".

Aos meus tios: Joana e José, que me acolheram como neta, com muito amor e carinho. Obrigada por terem aberto a porta da casa de vocês, por terem me deixado tão à vontade enquanto morei com vocês.

Ao meu primo Nelson Rodrigo e sua esposa Jacqueline Grippe, por terem me incluído em seu círculo de amigos, em seus programas de fim de semana, por terem sido minha principal companhia quando cheguei aqui.

Ao Marcus Vinícius Camillo Oliveira, que tem sido muito mais que um namorado, alguém que foi muito especial e fundamental me apoiando, me distraindo e me ajudando nessa reta final do trabalho.

Aos amigos...

Tenho muito que agradecer aos meus amigos...verdadeiros amigos...

Aqueles que me acompanham desde o ensino médio: Fernando Matsuzawa e Rafael Montorfano.

Aos que conquistei na faculdade: Andréia Sanfelice, Gustavo Schmidt, Flávia Wienskowski, Dayanne Wakimoto, Fernanda Sposito, Gabrielle Marconi Zago Ferreira e Andréia Camargo.

Aqueles que já nem me lembro há quanto tempo os conheço: Aline Lobo Pappa, Ariane Pereira e Tânia Salci.

Aos amigos que conquistei em São Paulo: Karla Letícia Santiago, Simone Sartoreto, Francielle Knebel, Oleno Netto, Edson de Oliveira, Gisele Facholi Bonfim, Tainara Sartoretto, Renato Massaro, Priscila Bosa, Juliana L. Rodrigues, Daniel L. Rodrigues, Carlos Eduardo, César Cunradi.

À Alessandra Satie Ofuchi, por dividir cada momento, cada problema, cada comemoração. Você se tornou minha irmãzinha nipônica, e nossa amizade se fortaleceu a cada dia desde que começamos a morar juntas. Obrigada por me dar a segurança de poder contar com você sempre.

Todos foram, sem dúvida essenciais para que eu chegasse até aqui, obrigada por terem acreditado em minha capacidade, me dando apoio, força, próximos ou distantes vocês fizeram e fazem toda diferença em minha vida.

Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP...

Ao Professor Doutor Sandro Rogério de Almeida, que me orientou nesse trabalho, e que mais que isso, apostou que eu seria capaz de desenvolvê-lo.

À Karen Spadari Ferreira, por seu incentivo, seu tempo investido em discussões, em ensinamentos de técnicas, em conversas jogadas fora.

À Soninha, que foi minha mãezona aqui em São Paulo, me aconselhando, me ouvindo, nas muitas gargalhadas no laboratório, tornando o ambiente muito mais agradável com seu jeito alegre.

À Karla Letícia Santiago e Vanessa Rosa Noal, por terem sido sempre minhas companheiras de trabalho, com as quais sempre pude dividir minhas angústias, dúvidas, erros e acertos.

Aos amigos mais novos do laboratório, Gilberto Kaihami, Telma de Fátima Emídio kimura, Lavínia Maria Romera, Fábio Seiti, Andressa Chiarella, Viviane Mazzo, com os quais eu estou aprendendo a compartilhar o meu conhecimento, e que me ensinam muitas coisas também.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia, em especial, Lucas Gonçalves Ferreira, Hadassa Cristina, Renée Oliveira, e Bioquímica, em especial, Francielle Hinterolz Knebel e Edson de Oliveira, por seu companheirismo, auxílio e risadas compartilhadas.

À Renata Albuquerque, pela ajuda com o citômetro, deixando-o sempre limpo, arrumadinho para que eu pudesse usá-lo da melhor maneira possível, além de dividir comigo minhas expectativas em relação aos resultados.

À Sueli, Edna e principalmente à Ana Dantas pela paciência e ajuda nas questões burocráticas relacionadas a este trabalho.

À Claudinha, pelo seu cafezinho que me manteve desperta durante o trabalho diário.

Ao Eliver Eid que me ensinou muito sobre citometria em pouco tempo, para que eu pudesse tocar meu trabalho sozinha.

A todos, por sua paciência com minhas perguntas, meus chilikques. Por terem dividido comigo também suas alegrias...tornando meus dias muito mais agradáveis.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Santos, S.S. Análise da capacidade migratória e da ativação de linfócitos T CD4⁺ por células dendríticas na paracoccidioidomicose experimental. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), que acomete preferencialmente o pulmão, sendo este um dos poucos órgãos que está em contínua e intensa interação com o meio ambiente e o sistema imune. O grande desafio para o sistema imune pulmonar é discriminar o que é nocivo e reagir de acordo. As células dendríticas (DCs) são apresentadoras de antígenos “profissionais” capazes de fazer o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T e são ideais para manter este equilíbrio delicado entre a tolerância e uma resposta imune efetora. Sabendo da importância dessas células no sistema imune e que a infecção por *P. brasiliensis* ataca preferencialmente o pulmão, células de lavado broncoalveolar (BAL), após infecção experimental com leveduras de *P. Brasiliensis*, foram analisadas. Nós observamos um significativo aumento de DCs no BAL após 24hrs da infecção intratraqueal com 10⁴ leveduras de *P. brasiliensis*. A caracterização das DCs mostraram que essas células expressaram CD11c, MHC-II e DEC205. A fim de verificar a capacidade de migração das DCs, as mesmas foram diferenciadas a partir de células de medula óssea e pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*, marcadas com CFSE e injetadas intratraquealmente em camundongos. Como controle negativo, utilizamos PBS e DCs não pulsadas com o fungo. Os resultados mostraram, que após 12 horas de infecção, as DCs (CFSE⁺CD11c⁺), migraram para os linfonodos torácicos. No entanto, a quantidade destas células diminui discretamente após 24 horas de infecção. Além disso, não observamos DCs nos linfonodos regionais, quando analisamos os grupos controle. Dessa forma, as células pulmonares também foram marcadas *in vivo* injetando-se intratraquealmente o corante CFSE juntamente com leveduras de *P. brasiliensis*. Verificamos que após 12 horas, as DCs pulmonares, dos animais infectados com o fungo, migraram para os linfonodos regionais. Esses resultados comprovam que o fungo *P. brasiliensis* foi

capaz de ativar as DCs, induzindo sua migração para linfonodos regionais, e induziu nesse órgão uma resposta por células T evidenciada pela produção preferencial de IL-10.

Palavras-Chaves: Paracoccidioidomicose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Células dendríticas.

Santos, S.S. Analysis of the capacity of migration and activation of TCD4+ lymphocytes by dendritic cells in experimental paracoccidioidomycosis. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), which mainly affects the lungs. They are one of the few organs that are in constant and intense interaction with the environment and the immune system. The great challenge for the pulmonary immune system is to discriminate what is harmful and react accordingly. Dendritic cells (DCs) are "professionals" antigen-presenting cells and they can do the antigen processing. They can also do the presentation of peptides to T lymphocytes and are ideal for maintaining this delicate balance between tolerance and an effector immune response. Knowing the importance of these cells in the immune system and that the infection by *P. brasiliensis* preferentially attacks the lungs, cells from bronchoalveolar lavage (BAL), after experimental infection with yeasts of *P. Brasiliensis*, were analyzed. We observed a significant increase of DCs in BAL after 24 hours of intratracheal infection with 10^4 of yeast cells of *P. brasiliensis*. The characterization of these cells showed that DCs expressed CD11c, MHC-II and DEC205. In order to verify the ability of migration of DCs, they were differentiated from bone marrow cells and pulsed with yeasts of *P. brasiliensis*, they were also labeled with CFSE and injected intratracheally into mice. As a negative control, we used PBS and DCs that were not pulsed with the fungus. The results showed that after 12 hours of infection, the DCs (CFSE + CD11c +), migrated to the thoracic lymph nodes. However, the quantity of these cells decreases slightly after 24 hours of infection. Furthermore, we observed no DCs in regional lymph nodes when we analyzed the control groups. Thus, the lung cells were also labeled *in vivo* by injecting the CFSE dye intratracheally with yeasts of *P. brasiliensis*. We found that after 12 hours, pulmonary DCs of the animals infected with the fungus migrated to regional lymph nodes. These results indicate that the fungus *P. brasiliensis* was able to activate DCs, inducing their

migration to regional lymph nodes, and inducing a response in that organ by T cells as evidenced by preferential production of IL-10.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. *Paracoccidioides brasiliensis*. Dendritic cells.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Porcentagem de células FSc^{high} e $CD11c^{+}DEC-205^{+}$ de lavado broncoalveolar de camundongos após infecção intratraqueal com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- Tabela 2. Porcentagem de células FSc^{high} e $CD11c^{+}DEC-205^{+}$ de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*.
- Tabela 3. Porcentagem de células quanto à expressão de $CD11c$ e $MHC-II^{+}$ em pulmão de camundongos BALB/c 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).
- Tabela 4. Porcentagem de células quanto à expressão de $CD11c$ e $DEC-205$ em tecido pulmonar 12 e 24 h após injeção intra-traqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).
- Tabela 5. Porcentagem de células quanto à expressão de $CD11c$ e $DEC-205$ em linfonodos torácicos 12 e 24 h após injeção intra-traqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).
- Tabela 6. Porcentagem de células quanto à expressão de $CD11c$ e $MHC-II^{+}$ em pulmão de camundongos BALB/c 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). Dados referentes às figuras 3C e 3D.
- Tabela 7. Porcentagem de células quanto à proliferação, expressão de moléculas $CD4$ entre as células que proliferaram, e produção de $IL-17$ e $IL-10$ pelas mesmas, em células totais de linfonodos torácicos de camundongos BALB/c 12 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Caracterização de células de lavado broncoalveolar após infecção intratraqueal com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- Figura 2. Caracterização de células de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com 1×10^4 leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- Figura 3. Caracterização de células de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*.
- Figura 4. Caracterização de células de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*.
- Figura 5. Migração de células CD11c⁺ para linfonodos torácicos 12 e 24h após injeção intra-traqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).
- Figura 6. Migração de células CFSE⁺ para linfonodos torácicos 12 e 24 h após injeção intra-traqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).
- Figura 7. Migração de células CFSE⁺CD11c⁺ para linfonodos torácicos 12 após injeção intra-traqueal de leveduras de *P. brasiliensis* em suspensão de CFSE.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Porcentagem de células quanto à expressão de CD11c e MHC-II⁺ em linfonodos torácicos de camundongos BALB/c 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).
- Gráfico 2. Número de células CD4⁺/IL-10⁺ obtidas de tecido pulmonar de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.
- Gráfico 3. Número de células CD4⁺/IFN-γ⁺ obtidas de tecido pulmonar de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.
- Gráfico 4. Número de células CD4⁺/IL-10 obtidas de linfonodos torácicos de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.
- Gráfico 5. Número de células CD4⁺/IFN-γ⁺ obtidas de linfonodo torácico de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- APC** – *Antigen presenting cell* (Célula apresentadora de antígeno)
- BAL** – *Bronchoalveolar lavage* (Lavado Broncoalveolar)
- BSA** – *Bovine serum albumin* (Albumina bovina sérica)
- CD** – *Cluster of Differentiation*
- CEEAF/FCF** - Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- CFA** – *Cell free antigen* (Antígeno livre da parede do fungo)
- CFSE** - *Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester*
- CTL** – *Cytotoxic T lymphocytes* (Linfócito T Citotóxico)
- DC** – Célula dendrítica
- DC-SIGN** – *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*
- FACS** - *Fluorescent Activated Cell Sorting* (Separação de Célula pela Atividade de Fluorescência)
- Fc** – Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina
- FITC** – *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)
- FMO** – *fluorescence-minus-one*
- FSc** – *Foward Scatter* (Tamanho relativo)
- g** - giros
- GM-CSF** – *Granulocyte monocyte colony-stimulating factor* (Fator de Crescimento Celular de Monócitos e Granulócitos)
- gp43** – glicoproteína de 43 kDa
- h** - horas
- i.t.** - intratraqueal
- ICAM-3** – *Intercellular adhesion molecule 3*
- IFN-γ** – Interferon-gama
- IL** – Interleucina
- kDa** - *kilodalton*
- MHC** – *Major histocompatibility complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
- P.b.** – *Paracoccidioides brasiliensis*
- Pb18** – cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS – *Phosphate buffered saline* (Solução Salina de Fosfato Tamponada)

PCM – Paracoccidiodomicose

PE – *Phicoeritrina* (Ficoeritrina)

R10 – RPMI com 10 % de SFB

rpm – Rotações por minuto

RPMI – meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute - 1640”

SFB – Soro Fetal Bovino

SPF - *Specific Pathogen Free* (Padrão sanitário livre de patógenos específicos)

SSc – *Side Scatter* (Complexidade)

Th – *T helper* (Linfócito T auxiliar)

TLR – *Toll like receptor* (Receptores do tipo Toll)

TNF- α – *Tumor necrosis factor* (Fator alfa de necrose tumoral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Animais	30
3.2. Fungo.....	30
3.3. Preparação do inóculo.....	30
3.4. Infecção intratraqueal	30
3.5. Obtenção de células pulmonares e de linfonodos após infecção intratraqueal com <i>P. brasiliensis</i>	31
3.6. Marcação de suspensão celular com anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície.....	31
3.7. Migração de células dendríticas, derivadas de medula óssea, pulsadas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> para linfonodos mediastinais.	32
3.7.1. Obtenção de células dendríticas	32
3.7.2. Marcação de células dendríticas derivadas de medula óssea com Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester (CFSE).....	33
3.7.3. Análise da migração de células dendríticas geradas de medula óssea para linfonodos regionais.....	33
3.8. Produção de citocinas por linfócitos TCD4 ⁺ , obtidos de linfonodos mediastinais, em camundongos injetados com células dendríticas, derivadas de medula óssea, pulsadas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.8.1. Preparação de Antígeno livre da parede do fungo (CFA) de <i>P. brasiliensis</i>	34
3.8.2. Dosagem de proteínas	34
3.8.3. Ensaio de infecção e reestímulo para determinação de citocinas intracelulares por citometria de fluxo.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Rápida alteração no fenótipo de células CD11c ⁺ durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	36
4.2. Caracterização de células dendríticas no tecido pulmonar após infecção com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	40
4.3. Perfil de células pulmonares e de linfonodos torácicos, após injeção de células dendríticas geradas de medula óssea, e pulsadas com <i>P. brasiliensis</i>	42
4.4. Migração de células dendríticas (CFSE ⁺) derivadas de medula óssea e pulsadas com <i>P. brasiliensis</i> para linfonodos torácicos.	44

4.5. Proliferação e produção de citocinas por linfócitos TCD4 ⁺ obtidos de linfonodos mediastinais em camundongos injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	47
4.6. Perfil de linfócitos TCD4 ⁺ obtidos de linfonodos mediastinais em camundongos injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por 5 dias.....	48
4.7. Migração de DCs pulmonares para linfonodos torácicos após 12 horas de infecção com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS	688

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose profunda de natureza granulomatosa, que compromete preferencialmente o tecido pulmonar, o sistema linfático, o tecido mucocutâneo e, por contigüidade, qualquer outro órgão. A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Lutz, em pacientes apresentando granulomas ganglionares e com lesões na mucosa oral. Posteriormente, Splendore (1912) documentou quatro novos casos de PCM e em seu trabalho, isolou o agente etiológico em cultura e classificou-o como *Zymonema brasiliensis*. Numerosas tentativas para classificar e nomear esse microrganismo seguiram-se até que Almeida (1930) criou o novo gênero *Paracoccidioides* e o fungo foi classificado como *Paracoccidioides brasiliensis*.

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico térmico, crescendo na forma miceliar a temperatura ambiente de 25°C a 27°C, apresentando colônias de aspecto cotonoso, de crescimento lento e, microscopicamente, apresenta hifas hialinas delgadas septadas. Na forma de levedura a 35°C- 37°C, o fungo cresce como colônia cerebriforme, que ao exame microscópico pode apresentar formas arredondadas ou ovaladas, de dupla parede refringente, multibrotantes, com aspecto morfológico característico de roda de leme e com diâmetro variável de 1-30 µm (LACAZ et al., 1991).

Segundo Lacaz (2002), a posição sistemática do *P. brasiliensis* é:

Reino	<i>Fungi</i>
Filo ou Divisão	<i>Eumycota</i>
Subdivisão	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Hyphomycetes</i>
Ordem	<i>Moniliales</i>
Família	<i>Moniliaceae</i>
Gênero	<i>Paracoccidioides</i>
Espécie	<i>brasiliensis</i>

O *habitat* natural de *P. brasiliensis* ainda é desconhecido existindo estudos que relatam o isolamento do fungo a partir de amostras de solo (SILVA-VERGARA, 1998), sugerindo que este é o mais provável nicho ecológico deste 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 via de entrada deste fungo no homem (McEWEN, 1987). No hospedeiro humano, acredita-se que o fungo penetre pelas vias aéreas superiores, pela inalação de conídios, provocando um complexo primário pulmonar. Estas lesões podem regredir, com destruição do fungo, ou progredir, disseminando pela via linfática ou hematogênica para outros órgãos (RESTREPO; MONCADA, 1972).

Geograficamente, a PCM está restrita a países da América Latina como Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (FRANCO et al., 1987), sendo a micose sistêmica mais comum no Brasil, tendo maior incidência em regiões de vegetação abundante como em florestas tropicais. Casos relatados fora das áreas endêmicas são denominados como “doença de importação”, devido ao fato dos pacientes terem residido nestas áreas em época anterior à manifestação da doença, já que a mesma pode possuir período de latência de 4 a 60 anos (em média 14 anos) (RESTREPO, 1985). A progressão da infecção fúngica causada pelo *P. brasiliensis* é mais comum nos homens com idade entre 30 e 60 anos, na proporção de 13 homens para uma mulher em áreas endêmicas (LACAZ, 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 estrogênio bloqueia a transição da forma miceliana (forma infectante do fungo) para a leveduriforme (forma parasitária) (LOOSE et al., 1983; RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988 e CLEMONS et al., 1989).

Pinzan et al. (2010), estudaram um modelo animal de castração para determinar a importância de hormônios masculinos e femininos no desenvolvimento e progressão da paracoccidioidomicose. Após 30 dias de infecção intraperitoneal, as células de baço dos machos castrados, que foram tratados com estradiol, responderam ao estímulo com paracoccina pela produção de maior quantidade de IFN- γ e menor de IL-10, produzindo um padrão de citocinas semelhante às fêmeas intactas, nas mesmas condições experimentais. Ainda nas mesmas condições, fêmeas castradas e tratadas com testosterona tiveram aumento na produção de IL-10 e diminuição de IFN- γ , sendo este um padrão de citocinas liberados por células de machos intactos. Esses dados confirmam o papel importante dos hormônios em determinar susceptibilidade e resistência ao *P. brasiliensis*.

Coutinho et al. (2002), publicaram um estudo sobre 3181 óbitos por PCM no Brasil entre 1980 e 1985. A taxa média de mortalidade foi de 1,45 casos por milhão de habitantes. A doença prevaleceu como endemia nas áreas rurais e a taxa de mortalidade predominou em indivíduos do sexo masculino, atingindo 84,75% dos óbitos. 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. Como a PCM não é de notificação compulsória, é difícil determinar com precisão o número de pessoas afetadas por essa doença.

Prado et al. (2009), mapearam a distribuição espacial de mortes, sexo, idade e outros fatores associados com a mortalidade por micoses sistêmicas no Brasil entre os anos de 1996 e 2006. Nesse período as mortes por micoses sistêmicas atingiram 3.583 pessoas, sendo aproximadamente 51,2% causadas pela paracoccidioidomicose, doença que foi a mais importante causa de morte entre as micoses sistêmicas. Nos primeiros anos do estudo a taxa anual de mortes foi de 171 indivíduos, já no último ano do estudo esse número diminuiu para 148 mortes/ano. Assim como o encontrado por Blotta et al. (1999), o maior número de casos foi na região sudeste, principalmente no estado de São Paulo, seguido pela região sul, principalmente no Paraná. O maior número de mortes ocorreram em pacientes com 30 anos de idade ou mais e do sexo masculino.

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). 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 PCM manifesta-se, como outras micoses profundas, sob a forma de infecção ou doença. A PCM-infecção caracteriza-se pela ausência de sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (LACAZ et al., 1959). As manifestações clínicas que caracterizam a PCM-doença apresentam sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais: 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, que afeta predominantemente jovens de ambos os sexos e compromete preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos, medula óssea) (GIRALDO et al., 1976). A resposta imune celular está usualmente deprimida, embora ocorra aumento da produção de anticorpos específicos (FRANCO, 1986). A forma crônica é a mais freqüentemente encontrada (cerca de 90% dos casos), tem duração prolongada e instalação lenta e gradual. As lesões permanecem localizadas (forma unifocal) ou envolvem mais de um órgão ou sistema (forma multifocal). A resposta imune humoral é variável e a resposta celular é preservada (FRANCO, 1986).

O diagnóstico da PCM é realizado através de métodos diretos e indiretos (diagnóstico sorológico). Os métodos diretos incluem exames microscópicos de espécimes biológicos do paciente (pus, escarro, biópsia), cultivo em meio de cultura próprio para isolamento do agente e inoculação em animais de experimentação. Quando são atingidos órgãos internos, os testes sorológicos têm especial valor, sendo o mais utilizado a imunodifusão em gel de ágar.

O *P. brasiliensis* sintetiza numerosas substâncias (polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, lipídeos e glicoproteínas) que reúnem condições físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos. Kenetsuda et al. (1972), indicaram que a parede celular de *P. brasiliensis* é constituída por polissacarídeos, particularmente α e β -1,3 glucana. A α -1,3-glucana é exclusiva na fase de levedura e a β -1,3-glucana presente na fase de bolor. Somada a estas diferenças bioquímicas encontra-se também a galactomanana, um componente imunogênico presente em maior proporção na fase de bolor, enquanto na fase de levedura são mais encontrados glucosaminas e glicoproteínas. Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM demonstraram que apenas a glicoproteína com 43 kDa (gp43) era imunorreativa por 100% dos soros de PCM e não reagia com soros normais (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991). 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). Títulos de anticorpos anti-gp43 têm sido usado para monitorar a resposta de pacientes ao tratamento. A titulação de anticorpos é

utilizada como parâmetro para avaliar a terapêutica e determinar o prognóstico da doença, e o aumento dos níveis de anticorpos está correlacionado à gravidade da doença (BIAGIONI et al., 1984). Mais recentemente, também foi caracterizada a proteína de 30 kDa, que também participa da adesão do fungo se ligando a laminina. Essa proteína é encontrada em maior quantidade em isolados de *P. brasiliensis* que possuem maior capacidade de adesão, e foi verificado em ensaios com monocamada de células epiteliais, com essas duas proteínas, inibiram a adesão do fungo às células (ANDREOTTI et al., 2005).

Dados clínicos e experimentais indicam que a imunidade mediada por células têm importante papel na defesa do hospedeiro contra infecção por *P. brasiliensis*, enquanto resposta celular deprimida e aumento da produção de anticorpos estão associados às formas mais severas da doença (FRANCO, 1986, CASTAÑEDA et al., 1988).

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/Sn), intermediários (BALB/c, C57Bl/10 e C3He/Fe) e suscetíveis à doença (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn). A resposta imune a antígenos do fungo foi estudada neste 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).

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 de produção elevada de IL-5, IL-10 e TNF- α , padrão característico de uma resposta do tipo Th2 (CALICH; KASHINO, 1998).

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T 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 celular 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 consequência de uma série de interações envolvendo diferentes tipos celulares. Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com células apresentadoras de antígeno (APCs), proliferem e se diferenciem em células efetoras.

As células dendríticas (DCs), macrófagos e linfócitos B são células apresentadoras de antígenos “profissionais” capazes de fazer o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T (UNANUE; ALLEN, 1987). As DCs foram descritas por Steinman e Cohn (1973) 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 DCs são células apresentadoras de antígenos capazes de fazer o “link” 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” (WICK, 2003).

As DCs 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 (revisado por JACOBS et al., 2008).

As DCs podem ser subdivididas em diferentes subpopulações, que possuem como característica fenotípica comum a expressão da molécula CD11c. As principais diferenças fenotípicas entre as subpopulações de DCs são a expressão diferencial dos marcadores CD11b, CD8 e B220. As DCs que expressam B220 apresentam quantidades intermediárias da molécula CD11c em sua superfície, e são denominadas “células dendríticas plasmocitóides” (pDCs). As DCs caracterizadas pela alta expressão de CD11c são denominadas “células dendríticas convencionais” (cDCs) e subdivididas, em células CD8 positivas e CD8 negativas, sendo que as últimas expressam a molécula CD11b. Há ainda populações de DCs caracterizadas pela expressão de CD4 concomitante ou não, com a expressão de CD8. No entanto, essa subpopulação é menos estudada. As diferentes subpopulações de DCs

apresentam, além das diferenças fenotípicas, algumas diferenças funcionais e em seu desenvolvimento (SHORTMAN; LIU, 2002; SHORTMAN; NAIK, 2007).

Além de poderem ser distinguidas quanto às subpopulações, as DCs podem ser diferenciadas quanto ao seu estado de ativação. Na ausência de sinais inflamatórios ou infecção, as DCs possuem um fenótipo caracterizado pela baixa expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) e das moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40. Quando sinais inflamatórios estão presentes ou as DCs são expostas a componentes derivados de patógenos, como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou RNA dupla fita, seu fenótipo sofre uma alteração significativa, com um aumento na expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras (GUERMONPREZ et al., 2002). Nos tecidos periféricos as DCs possuem uma alta capacidade de capturar antígenos e apresentam baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, sendo denominadas DCs imaturas. Quando neste estado de ativação, as DCs são pobres estimuladoras de respostas de células T. Quando componentes derivados de patógenos ou sinais inflamatórios estão presentes, as DCs sofrem um processo denominado maturação, compreendendo mudanças funcionais e fenotípicas. As DCs são então ditas DCs maduras e tornam-se capazes de estimular respostas de células T (Guermonprez et al., 2002). Durante o processo de maturação a expressão do receptor de quimiocina CCR6 diminui, ao passo que a expressão do receptor CCR7 aumenta. A expressão de CCR7 se dá em outras células além das DCs, como linfócitos T e B, as quimiocinas CCL19 e CCL21 são seus únicos ligantes e estão presentes constitutivamente em células epiteliais dos órgãos linfóides secundários. Essa ligação guia a migração das DCs maduras para linfonodos e sua fixação nas áreas de células T (revisado por FOSTER et al., 2008). Dessa forma, o processo de maturação das DCs integra-se ao processo de migração das mesmas em direção às áreas T dos linfonodos, fazendo com que a probabilidade do encontro com um linfócito T antígeno-específico aumente.

Os receptores de superfície relatados como responsáveis pela ativação e maturação das DCs são: receptores “Toll-like” (TLR), receptores de citocinas, receptores de TNF (TNF-R) e receptores para a porção Fc. Atualmente, sabe-se que DCs de camundongos expressam receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcR): Fc γ RI (CD64), Fc γ RIII e Fc γ RII (CD32) (FANGER et al., 1996 e ESPOSITO-FARESE et al., 1995). Em humanos, DCs derivadas de monócitos expressam

principalmente FcγII (CD32) e FcαR (CD89) (GEISSMANN et al., 2001). A identificação de receptores do tipo Toll trouxe uma grande contribuição no estudo do reconhecimento inato de microrganismos, entretanto, recentes evidências indicam que receptores do tipo “não-toll” também exercem um importante papel nesses processos, particularmente na imunidade antifúngica. Um exemplo são os membros da família dos receptores de lectina do tipo C, como o Receptor de Manose (MMR), DEC-205, ICAM-3, DC-SIGN, dectina-1, dectina-2 e as colectinas (WILLMENT; BROWN, 2007). O receptor DEC 205 pertence à família das lectinas tipo C do tipo I que inclui o receptor conhecido como MMR (“macrophage mannose receptor”) (JIANG et al., 1995; MAHNKE et al., 2000). Como o MMR, o receptor DEC 205 apresenta um domínio amino-terminal rico em cisteínas, um domínio de fibronectina tipo II e múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos (revisto por FIGDOR et al., 2002). Porém, a distribuição tecidual do DEC 205 difere substancialmente da distribuição do MMR. O primeiro é altamente expresso pelas CDs presentes nas zonas de células T dos tecidos linfóides, particularmente nas CDs CD8⁺ (DEN HAAN et al., 2000). Já o receptor MMR é expresso por macrófagos teciduais (GUO et al., 2000; LINEHAN et al., 1999). Boscardin et al (2006) e Trumpfheller et al (2006) demonstraram que anticorpos monoclonais contra o receptor de células dendríticas (anti-DEC 205 – INABA et al., 1995; SWIGGARD et al., 1995 e WITMER-PACK et al., 1995) são potentes imunógenos capazes de induzir imunidade celular (mediadas por células T CD4⁺ e CD8⁺) e humoral duradouras contra o antígeno de interesse.

Em vários modelos de doenças infecciosas, DCs estão sendo estudadas por sua capacidade de servir como adjuvante e vacina mediando proteção contra bactérias, vírus, parasitas ou patógenos fúngicos (MOLL; BERBERICH, 2001). Boscardin et al. (2006), utilizou o anticorpo anti-DEC 205 fundido à proteína circumsporozoita (CSP) expressa pelas formas esporozoitas do *Plasmodium yoelii* (agente causador da malária murina). A administração de uma única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-CSP na presença de um estímulo de maturação para as CDs foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN-γ, em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, a indução de uma boa resposta imune humoral também foi observada após a administração de uma dose de reforço do anticorpo, na ausência de qualquer outro adjuvante. No caso de Trumpfheller et al. (2006), o anticorpo anti-DEC 205 foi acoplado à proteína GAG do vírus HIV (“human immunodeficiency virus”). Estes autores também demonstraram que uma

única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-GAG foi capaz de levar a indução de uma forte resposta imune mediada principalmente por células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Além disso, proteção foi observada nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-GAG (na presença de estímulo de maturação) quando estes foram desafiados com um vírus vaccinia transgênico expressando a proteína GAG. Ahuja et al. (1999), mostraram que DCs pulsadas com proteínas de *Leishmania donovani* e transferidas adotivamente para camundongos BALB/c induziram uma resposta antígeno específica do tipo Th1.

DCs estão envolvidas diretamente na relação entre patógeno e o sistema imune do hospedeiro, levando na maioria das vezes a uma eficiente resposta imune no hospedeiro, com ativação de linfócitos T “naive”. No entanto, alguns patógenos têm a capacidade de afetar as funções biológicas destas células 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 a IL-12. Van Tvelt et al. (2002), verificaram que *Trypanosoma cruzi* é capaz de inibir moléculas de MHC e co-estimuladoras, em modelo murino, impedindo ativação eficiente das DCs.

A transferência adotiva de DCs pulsadas com *Candida* e produtoras de IL-10 induziram a ativação de células T CD4⁺CD25⁺ em linfonodos mesentéricos, com diminuição da resposta inflamatória nos sítios de infecção e contribuiu para a ocorrência de uma memória imune protetora contra o fungo. DCs transfectadas com RNA de *Cryptococcus neoformans* também induziram proteção em modelo murino de criptococose pulmonar (BOZZA et al., 2004).

Nosso laboratório mostrou (ALMEIDA; LOPES 2001, FERREIRA et al., 2003) que DCs de camundongos resistentes a PCM, quando comparados com camundongos susceptíveis, são mais eficientes em induzir uma resposta do tipo Th1 tanto *in vitro* como *in vivo*. Recentemente mostramos que DCs pulmonares de camundongos B10A, infectados intratraquealmente com *P. brasiliensis*, são células produtoras de grandes quantidades de IL-10, ao contrario de camundongos A/J, e a produção dessa citocina foi mediado pela ligação com os receptores do tipo dectin-1 e TLR-2 (FERREIRA et al., 2007).

Como células dendríticas são as principais células iniciadoras de uma resposta imune e sabendo que a infecção pulmonar é o foco primário na PCM,

procuramos saber qual o perfil de células pulmonares assim como a migração para órgãos linfóides de DCs pulmonares após infecção com *P. brasiliensis*.

2. OBJETIVOS

- Quantificação e determinação do fenótipo de DCs nos pulmões de camundongos após infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*.
- Avaliar a capacidade de DCs em migrar até os órgãos linfóides secundários (linfonodos torácicos), assim como a expressão de moléculas CD11c, MHC-II e moléculas co-estimuladoras nessas células;
- Determinar o número de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , IL-4, IL-10 ou IL-17 em órgãos linfóides secundários de camundongos após migração de DCs, avaliando assim, o tipo de resposta imune induzida (Th1/Th2/Th17).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c com 8 a 12 semanas de vida foram obtidos do Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEEA/FCF.

3.2. Fungo

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

3.3. Preparação do inóculo

Leveduras da cepa Pb18 foram coletadas em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), deixando-se decantar as partículas maiores. A suspensão mais leve, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi coletada com auxílio de seringa de insulina e a contagem do número de células realizada utilizando-se câmara de Neubauer.

3.4. Infecção intratraqueal

Os animais foram anestesiados com uma solução de Xilazina (pré-anestésico), Cetamina (anestésico) e PBS na proporção de 3:3:4. Após completo estado de anestesia, evidenciado pela ausência de resposta a estímulos visuais e motores os animais foram imobilizados e infectados por injeção intratraqueal (i.t.) com suspensão contendo 1×10^4 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50 µl de PBS ou 1×10^5 DCs pulsadas na proporção de 1:1 com leveduras do fungo.

3.5. Obtenção de células pulmonares e de linfonodos após infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*

Células pulmonares foram purificadas de camundongos BALB/c conforme descrito por Gonzalez-Juarrero e Orme (2001) após 4 e 24 horas de infecção. Os animais foram anestesiados e após perfusão do pulmão com 5 mL de PBS contendo 100 U/mL de heparina, o pulmão foi macerado e incubado por 30 minutos a 37°C na presença de tampão de digestão, contendo 0.7 µg/mL de colagenase IV (SIGMA – ALDRICH – St. Louis). As partículas maiores foram removidas passando a suspensão de células através de uma membrana de nylon.

A obtenção de células de lavado broncoalveolar foi realizada após 12 e 24 h de infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*. Para isso, os camundongos foram sacrificados e a região da traquéia foi exposta para realização das lavagens (uma lavagem com volume de 1 ml, seguida de duas lavagens de 0,5 ml de PBS) com o auxílio de uma cateter (BD Angiocath 20_{GAX}1.16_{IN}).

Os linfonodos torácicos (mediastinais, axilares, paratraqueal e paratímico) foram retirados e macerados para obtenção de células, as quais foram centrifugadas e ressuspensas em volume correspondente e foram marcadas com anticorpos monoclonais para imunofenotipagem.

3.6. Marcação de suspensão celular com anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície

As células obtidas de lavado broncoalveolar, linfonodos e pulmão após digestão, foram ajustadas a uma suspensão contendo 1×10^5 células em 70 µl de PBS com 3% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab – Campinas, Brasil). A essa suspensão foi adicionado 30 µl de PBS contendo os anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos numa combinação de cores descritas a seguir: FITC-CD11c (HL3), PE-CD11c (HL3), PE-I-A/I-E (M5-114.15.2), APC-CD11c (HL3), APC-CD205 (NLDC-145), PECy5-CD11c (HL3), APC- CD103 (2E7), APC-DCSIGN (LWC06), PE-CD80 (16-10A1), PE-CCR7 (4B12), por 20 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas e centrifugadas a 1800 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuspendido em PBS com 3% SFB. Para análise por citometria de fluxo foi utilizado o aparelho FACS Canto e os dados gerados analisados com auxílio de software FlowJo (TREE STAR, Inc.- USA).

Para distinguir células autofluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizou-se a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (ROEDERER et al., 2001). Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados limite FMO, e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados verdadeiros positivos. O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal no qual será medido um determinado marcador revelará a auto-fluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto-fluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo. (HERZENBERG et al., 2006).

3.7. Migração de células dendríticas, derivadas de medula óssea, pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* para linfonodos mediastinais.

3.7.1. Obtenção de células dendríticas

DCs derivadas da medula óssea de camundongos foram obtidas segundo protocolo descrito por Inaba et al. (1992). Tíbias e fêmur dos camundongos foram retirados e lavados com 3 – 5 mL de PBS acrescido de 1% de albumina bovina (BSA). Em seguida as hemácias foram lisadas com tampão hemolítico. As células remanescentes foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de SFB (Cultilab – Campinas, Brasil), 10 mg/mL de gentamicina e suplementado com 50 ng/mL da citocina recombinante GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos - Pharmingen) por 7 dias na estufa a 37° C com 5% de CO₂. No 3° e 5° dia, as células não aderentes (granulócitos e linfócitos) foram removidas e as células aderentes recultivadas em meio RPMI com fator de crescimento (GM-CSF). No 7° dia de cultura, as células não aderentes (onde se encontram as populações enriquecidas de células dendríticas) foram removidas e analisadas através de citometria de fluxo (FacsCanto), para verificação dos marcadores de superfície CD11c e MHC-II, utilizando-se para isso, os anticorpos: anti-CD11c (HL3) e anti-I-A/I-E (M5-114.15.2).

3.7.2. Marcação de células dendríticas derivadas de medula óssea com Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester (CFSE).

As DCs derivadas de medula óssea foram ressuspensas em PBS adicionada de 1% de albumina bovina (BSA) a temperatura ambiente ajustados para uma concentração final de 1×10^5 células/ml. A essa suspensão foi adicionado 1 μ l de uma solução 1 mM de CFSE (Molecular Probes Cat. C34554) e a mesma foi incubada 10 minutos a 37° C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação foram adicionados 4 ml de PBS com 3% de SFB gelado a cultura de células para interromper a reação. A mesma foi incubada por 5 minutos no gelo e posteriormente centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm. As células foram lavadas 3 vezes para retirar todo o excesso de CFSE. Na última centrifugação as mesmas foram ressuspensas em 50 μ l para infecção intratraqueal.

3.7.3. Análise da migração de células dendríticas geradas de medula óssea para linfonodos regionais.

A análise da capacidade de migração de DCs para linfonodos foi baseada no protocolo descrito por Bhatt et al. (2004). DCs foram geradas e marcadas com CFSE conforme protocolo descrito acima. Posteriormente, as mesmas foram pulsadas por 4 h com leveduras de *P. brasiliensis* na proporção de 1:1. Após marcação, 1×10^5 DCs foram injetadas intratraquealmente em camundongos. Como controle foram injetadas DCs não pulsadas com o fungo. Células pulmonares e de linfonodos mediastinais e axilares foram retirados após 12 e 24 h de infecção e analisados por citometria de fluxo. Foi analisada a presença de células FITC positivas, APC-DEC205⁺ (NLDC-145), PE-CD11c⁺ (HL3), APC-CD11c⁺ (HL3) e anti-I-A/I-E (M5-114.15.2).

3.8. Produção de citocinas por linfócitos TCD4⁺, obtidos de linfonodos mediastinais, em camundongos injetados com células dendríticas, derivadas de medula óssea, pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

3.8.1. Preparação de Antígeno livre da parede do fungo (CFA) de *P. brasiliensis*.

O fungo *P. brasiliensis* (cepa Pb 18) foi dissolvido em 10 mL de PBS e agitado em vortex. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm, e então, o sobrenadante foi recolhido para obtenção do antígeno CFA.

3.8.2. Dosagem de proteínas

A concentração do CFA foi realizada segundo método proposto por Bradford (1976), que utiliza “Coomassie Brilliant Blue” (CBB) G-250 (Sigma – St. Louis – Estados Unidos) como reativo e BSA 1,0 mg/mL como padrão.

3.8.3. Ensaio de infecção e reestímulo para determinação de citocinas intracelulares por citometria de fluxo

DCs foram obtidas como descrito no item 3.7.1. e pulsadas durante 4 horas com leveduras de *P. brasiliensis*. Após a interação 1×10^5 DCs foram injetadas intratraquealmente em camundongos BALB/c. Como controle foram injetados DCs não pulsadas com o fungo. Após 12 horas de infecção, pulmões e linfonodos foram retirados e as células obtidas como descrito no item 3.5. Às células obtidas foram adicionados Brefeldina A (1 μ l da solução 1000x concentrada em 999 μ l de R10 contendo as células), para interromper o processo de liberação das citocinas, acumulando-as no interior do citoplasma. As mesmas foram marcadas com CFSE na concentração de 1 μ M e re-estimuladas com CFA, na concentração de 2 μ g/ml durante 72 h. Após incubação as células foram transferidas para uma placa com fundo em V com 96 poços, e mantidas em gelo. Aos poços foram adicionados 30 μ l de PBS contendo os anticorpos anti-CD4 como descrito no item 3.6 com anticorpos conjugados com os fluorocromos: PE-CD4 (H129.19) e APC-CD4 (RM-4). Após a marcação de superfície, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 3% SFB, e foram fixadas com 100 μ l solução de fixação do Kit “Fixation & Permeabilization” (eBioscience Cat. 88-8823-88), por 15 minutos no escuro. Após incubação realizou-se a lavagem e foram adicionados 100 μ l de solução permeabilizante presente no kit, sempre homogeneizando com auxílio de ponteira. A placa foi centrifugada 5 minutos a 500 g. O sobrenadante foi desprezado e deu-se início a marcação intracelular. A cada poço foi adicionado 30 μ l de PBS contendo os anticorpos conjugados aos fluorocromos PE-IL10 (JESS-16E3), PE-IL-17 (TC11-18H10) e APC-

IL-4 (11B11). Após 20 minutos de incubação no escuro as células foram lavadas e ressuspensas em 100 µl da solução de fixação e foram transferidas para tubos específicos para a técnica de Citometria de Fluxo. A leitura foi realizada em FACs Canto II e a análise realizada em software FlowJo.

Camundongos BALB/c também foram infectados com DCs pulsadas com o fungo e também por leveduras de *P. brasiliensis*, sendo os controles somente DC e PBS, respectivamente, por um período de 5 dias, e após foram sacrificados, os linfonodos foram retirados e as células purificadas. Às mesmas, foi adicionado Brefeldina A por 12 horas, e após esse período essas células foram marcadas assim como descrito acima com anticorpos conjugados com os fluorocromos: PE-IL10 (JESS-16E3), PE-IL-17(TC11-18H10) e APC-IL-4(11B11), e FITC-IFN-γ (XMG1.2).

3.9. Marcação de células pulmonares *in vivo* com CFSE e análise da migração de células CFSE⁺/ CD11c⁺ nos linfonodos torácicos após 12 horas de infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.

Com o intuito de verificar se DCs locais também possuíam a capacidade de migrar para os linfonodos torácicos após infecção com *P. brasiliensis* uma solução de CFSE foi preparada diluindo o composto a uma concentração de 25 µM em DMSO, e posteriormente essa solução foi diluída em PBS a concentração de 8 µM. Uma suspensão de 1x10⁵ leveduras de *P. brasiliensis* foi preparada na solução de CFSE. A mesma foi injetada intratraquealmente em camundongos anestesiados. Após 12 horas os linfonodos foram retirados e as células purificadas como descrito no item 3.5. Estas células foram marcadas com o anticorpo anti- CD11c-PECy5 (HL3), como descrito no item 3.6. Como controles foram utilizados camundongos injetados intratraquealmente com DMSO diluído em PBS, e também solução de 8 µM CFSE.

4. RESULTADOS

4.1. Rápida alteração no fenótipo de células CD11c⁺ durante a infecção por *P. brasiliensis*.

A fim de estudar o papel do *P. brasiliensis* na população de células pulmonares após curto período de infecção, camundongos BALB/c foram infectados intratraquealmente com leveduras desse fungo. Após 4 e 24 horas foram realizados lavados broncoalveolares dos animais e as células obtidas submetidas à marcação com anticorpos anti-CD11c e anti-DEC-205 e analisadas por citometria de fluxo. As células FSc^{high} representam em média 15,4% das células totais. Partindo dessas células verificou-se que a porcentagem de células CD11c⁺ parece não alterar após 4 horas, por outro lado há um aumento dessas células após 24 horas que passam a representar 77% das células FSc^{high}. Os resultados mostraram que a porcentagem de células que expressam CD11c^{high} e DEC-205 aumentam após 24 h de infecção (Figura1/Tabela1). Com o mesmo intuito foram analisadas também células obtidas após digestão do tecido pulmonar dos camundongos infectados após os mesmos períodos, e nenhuma mudança muito evidente foi verificada quanto à presença das DCs (Figura 2/ Tabela 2). Observamos que o número de células CD11c^{high} foi menor no tecido pulmonar digerido em relação ao lavado broncoalveolar. Apesar de estar em número menor, as células CD11c^{high}, na sua maioria, expressam DEC-205. Outra observação importante foi que após 24h de infecção as DCs aumentaram a expressão da molécula de MHC-II quando comparada ao controle (Figura 3/Tabela 3).

Figura 1. Caracterização de células de lavado broncoalveolar após infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*. Células totais de lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c foram obtidas após 4 e 24h de infecção com 10^4 leveduras de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ l de PBS. Como controle foram utilizados animais injetados com 50 μ l de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, está descrita nos itens **A** (células totais de lavado broncoalveolar), **B** (apenas análise de células FSc^{high} SSSc^{high}) e **C** (análise somente das células CD11c⁺)

Tabela 1. Porcentagem de células FSc^{high} e $CD11c^{+}DEC-205^{+}$ de lavado broncoalveolar de camundongos após infecção intratraqueal com leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dados referentes à figura 1.

% de células	Controle	4 horas	24 horas
FSc^{high}	14,2	14,7	17,5
$CD11c^{high}$	50,9	49,8	77,1
$CD11c^{+} DEC-205^{+}$	30,1	19,2	48

Figura 2. Caracterização de células de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com 1×10^4 leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Células totais de tecido pulmonar de camundongos BALB/c foram obtidas após 4 e 24 h de infecção com 10^4 leveduras de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ l de PBS. Como controle foram utilizados animais injetados com 50 μ l de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, está descrita nos itens **A** (células totais pulmonares), **B** (apenas análise de células FSc^{high} SSc^{high}) e **C** (análise somente das células $CD11c^{+}$).

Tabela 2. Porcentagem de células FSc^{high} e CD11c⁺DEC-205⁺ de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*. Dados referentes à figura 2.

% de células	4 horas	24 horas
FSc ^{high}	13.2	19.3
CD11c ^{high}	9,26	9,29
CD11c ⁺ DEC-205 ⁺	80,8	66,3

Figura 3. Caracterização de células de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*. Células totais de tecido pulmonar de camundongos BALB/c foram obtidas após 12 e 24 h de infecção com 10^5 leveduras de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ l de PBS. Como controle foram utilizados animais injetados com 50 μ l de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, está descrita nos itens **A** (células totais pulmonares), **B** (apenas análise de células FSc^{high} SSc^{high}) mostrando células CD11c⁺ MHC-II⁺.

Tabela 3. Porcentagem de células quanto à expressão de CD11c e MHC-II⁺ em pulmão de camundongos BALB/c 12 e 24 h após injeção intra-traqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). Dados referentes às figuras 3A e 3B.

% de células	12 horas		24 horas	
	PBS	<i>P.b.</i>	PBS	<i>P.b.</i>
FSc ^{high}	54	52,8	44,1	49,1
CD11c ⁺ MHC-II ⁺	11,2	8,1	17,8	32,7

4.2. Caracterização de células dendríticas no tecido pulmonar após infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.

Para melhor caracterização das células CD11c⁺ presentes nos pulmões após infecção com leveduras de *P. brasiliensis*, camundongos BALB/c foram sacrificados 12 e 24 horas após a infecção intra-traqueal. Nesse experimento verificamos que após 12 horas há uma diminuição das células CD11c⁺ no tecido pulmonar digerido, e que este número começa a aumentar após 24 h de infecção em relação ao período de 12 h. Porém ao analisarmos somente as células CD11c⁺ do tecido pulmonar quanto a expressão das moléculas CCR7, CD103, DC-SIGN e CD80, verificamos um aumento no número de células CD11c⁺ que expressam CCR7 após a infecção (9,31% e 7,19%) em relação a seus controles (8,06% e 5,29%) (figura 6C). Verificamos o mesmo para células que expressam CD103 e CD80 (figura 6C).

Figura 4. Caracterização de células de tecido pulmonar após infecção intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis*. Células totais de tecido pulmonar de camundongos BALB/c foram obtidas após 12 e 24h de infecção com 10^5 leveduras de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ l de PBS. Como controle foram utilizados animais injetados com 50 μ l de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, está descrita nos itens **A** (células totais pulmonares – FSc e SSc), **B** (apenas análise de células FSc^{high} SSc^{high}) mostrando células CD11c⁺, e em **C** (apenas as células CD11c⁺) mostrando as moléculas CCR7, CD103, CD80 e DC-SIGN.

4.3. Perfil de células pulmonares e de linfonodos torácicos, após injeção de células dendríticas geradas de medula óssea, e pulsadas com *P. brasiliensis*.

Para melhor entender o papel das DCs e sua interação com *P. brasiliensis* essas células foram geradas a partir de medula óssea de tíbia e fêmur de camundongos e cultivadas em meio RPMI suplementado com citocina recombinante GM-CSF por 7 dias na estufa de 37° C com 5% de CO₂. Essas células foram caracterizadas como sendo CD11c^{high}, MHC-II^{high} e DEC-205⁻ (dados não mostrados). As células obtidas foram pulsadas durante 4 horas com leveduras do fungo na proporção (1:1) e foram injetadas intratraquealmente em camundongos BALB/c. Como controle foram injetadas DCs não pulsadas com *P. brasiliensis*. Analisamos o perfil dessas células no tecido pulmonar, observamos que após 24 h da injeção das DCs (CD11c^{high}DEC-205⁻) pulsadas com *P. brasiliensis*, o número de células CD11c^{high}DEC-205⁺ aumentou (Figura 4B/ Tabela 4). Entretanto, quando as células dos linfonodos torácicos foram analisadas, observamos um aumento de células CD11c^{high} e DEC-205⁻ após 12 horas da injeção. Estes dados sugerem que as células injetadas e pulsadas com *P. brasiliensis*, migraram para os linfonodos (Figura 5D/ Tabela 5).

Figura 5. Migração de células CD11c⁺ para linfonodos torácicos 12 e 24h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). DCs foram geradas a partir de células indiferenciadas de medula óssea de camundongos BALB/c conforme descrito anteriormente. 2×10^6 células/ml foram pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) durante quatro horas. Após esse período as células foram injetadas intratraquealmente e células pulmonares e de linfonodos analisadas em FACS após 12 e 24 h. Como controle foi utilizado camundongos injetados com PBS e com DCs na ausência de contato com fungo. Os dados foram analisados através da estratégia de *gating* (software *Flowjo*). **A** e **C** mostram células totais de pulmão e linfonodos torácicos respectivamente; **B** e **D** mostram células CD11c⁺DEC-205⁺.

Tabela 4. Porcentagem de células quanto à expressão de CD11c e DEC-205 em tecido pulmonar 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). Dados referentes às figuras 5A e 5B.

% de células	12 horas		24 horas	
	DC	DC pulsadas com <i>P.b.</i>	DC	DC pulsadas com <i>P.b.</i>
FSc^{high}	54	52	53	44
CD11c⁺	21,8	24,7	25	36,7
CD11c⁺ DEC-205⁺	17	10,9	15,9	29,7

Tabela 5. Porcentagem de células quanto à expressão de CD11c e DEC-205 em linfonodos torácicos 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). Dados referentes às figuras 5C e 5D.

% de células	12 horas		24 horas	
	DC	DC pulsadas com <i>P.b.</i>	DC	DC pulsadas com <i>P.b.</i>
CD11c⁺	6,7	22,4	8,2	7,9
CD11c⁺ DEC-205⁺	1,4	2,3	3,0	2,9

4.4. Migração de células dendríticas (CFSE⁺) derivadas de medula óssea e pulsadas com *P. brasiliensis* para linfonodos torácicos.

Para comprovar a migração de DCs injetadas, essas células foram diferenciadas de células de medula óssea marcadas com CFSE, pulsadas com *P. brasiliensis* e injetadas em camundongo. Nossos resultados mostraram que as células injetadas nos animais, quando ativadas pelo fungo, foram capazes de migrar para os linfonodos torácicos no período de 12 h. Além disso, essas células expressam altos níveis de MHC-II em sua superfície (Figura 5C e 5D/ Tabela 7). Já a partir de 24 horas o número de células com expressão dessas moléculas diminui nos linfonodos. Nos pulmões há uma diminuição na porcentagem de células CD11c⁺MHC-II⁺ em relação aos controles (Figura 5A e 5B/ Tabela 6).

Figura 6. Migração de células CFSE⁺ para linfonodos torácicos 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). DCs foram geradas a partir de células indiferenciadas de medula óssea de camundongos BALB/c conforme descrito em Materiais e Métodos. As mesmas foram marcadas com CFSE e 2x10⁶ células/ml foram pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1) durante quatro horas. Após esse período as células foram injetadas intratraquelmente e células pulmonares e de linfonodos analisadas em FACS após 12 e 24 h. Como controle foi utilizado camundongos injetados com PBS e com DCs na ausência de contato com fungo. Os dados foram analisados através da estratégia de *gating* (software *Flowjo*). **A** e **C** mostram células totais de pulmão e linfonodos torácicos respectivamente; **B** e **E** mostram células CD11c⁺MHC-II⁺ e **D** mostra células CFSE⁺.

Tabela 6. Porcentagem de células quanto à expressão de CD11c e MHC-II⁺ em pulmão de camundongos BALB/c 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). Dados referentes às figuras 6A e 6B.

% de células	12 horas		24 horas	
	DC	DC pulsadas com <i>P.b.</i>	DC	DC pulsadas com <i>P.b.</i>
FSC ^{high}	57,1	49,8	50,9	41,2
CD11c ⁺ MHC-II ⁺	35,1	14,9	22	15,5

Gráfico 1. Porcentagem de células quanto à expressão de CD11c e MHC-II⁺ em linfonodos torácicos de camundongos BALB/c 12 e 24 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1). Dados referentes às figuras 6F.

4.5. Proliferação e produção de citocinas por linfócitos TCD4⁺ obtidos de linfonodos mediastinais em camundongos injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

Através dos experimentos anteriores foi verificada a migração de DCs pulsadas com *P. brasiliensis* para linfonodos torácicos. Com o intuito de verificar o perfil de citocinas induzidas por essas células, um ensaio de linfoproliferação foi realizado com células totais de linfonodos obtidos após 12 h de injeção de DCs pulsadas com leveduras, e re-estimuladas *in vitro* com 2 µg/ml de CFA. A proliferação das células totais de linfonodos diminuiu em animais infectados em relação a animais controle, porém se comparados somente o grupo infectado, houve um pequeno aumento na proliferação quando as células foram reestimuladas com CFA. Além disso, observamos um aumento na produção das citocinas IL-10 e IL-17 por linfócitos TCD4⁺ que proliferaram após 12 h de injeção, quando re-estimulados com o antígeno de *P. brasiliensis*, em relação às células que não foram reestimuladas e também a produção basal de camundongos controle (injetados somente com PBS).

Tabela 7. Porcentagem de células quanto à proliferação, expressão de moléculas CD4 entre as células que proliferaram, e produção de IL-17 e IL-10 pelas mesmas, em células totais de linfonodos torácicos de camundongos BALB/c 12 h após injeção intratraqueal de células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* (1:1).

% de células	PBS	DC pulsadas com <i>P.b.</i> 12 horas	
	CFSE	CFSE	2µg/ml CFA
Proliferação	15,8	6,65	8,85
CD4	74,2	58,95	59,8
IL-17	0	3,88	6,14
IL-10	1,56	0,56	2,48

4.6. Perfil de linfócitos TCD4⁺ obtidos de linfonodos mediastinais em camundongos injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* por 5 dias.

Para detecção de citocinas intracelulares após maior período de infecção, o ensaio foi repetido e os camundongos foram sacrificados após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou DCs pulsadas com as mesmas. Os linfonodos torácicos e pulmão foram retirados e as células foram purificadas e incubadas por 12 h com Brefeldina A. Após essa incubação, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e intracelularmente com anticorpos anti-IL-10 e IFN- γ . A leitura foi realizada em FACS Canto II e a análise realizada em software FlowJo, e os dados expressos em número absoluto de células CD4⁺/IL-10⁺ e CD4⁺/IFN- γ ⁺.

Quando os animais foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* por 5 dias verificamos que no tecido pulmonar houve diminuição no número de células CD4⁺/IL-10⁺ e um pequeno aumento no número de células CD4⁺/IFN- γ ⁺ em relação ao controle (Gráfico 2 e 3). Nesses mesmos animais verificamos que nos linfonodos torácicos houve aumento tanto nas células CD4⁺/IL-10⁺ quanto nas CD4⁺/IFN- γ ⁺ (Gráfico 4 e 5). Os animais também foram injetados com DCs pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*, e 5 dias após, verificamos que nos pulmões houve um maior número de células CD4⁺/IL-10⁺ e nas células CD4⁺/IFN- γ ⁺ em relação ao controle e também quando comparada com animais infectados somente com *P. brasiliensis* (Gráfico 2 e 3). Já nos linfonodos desses animais houve aumento somente no número de células CD4⁺/IL-10⁺, enquanto o número de células CD4⁺/IFN- γ ⁺ foi semelhante ao controle (Gráfico 4 e 5).

O número de células CD4⁺/IL-17⁺ foi indetectável em nossos ensaios (dados não mostrados).

Gráfico 2. Número de células CD4⁺/IL-10⁺ obtidas de tecido pulmonar de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

Gráfico 3. Número de células CD4⁺/IFN-γ⁺ obtidas de tecido pulmonar de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

Gráfico 4. Número de células CD4⁺/IL-10 obtidas de linfonodos torácicos de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

Gráfico 5. Número de células CD4⁺/IFN-γ⁺ obtidas de linfonodo torácico de camundongos BALB/c após 5 dias de infecção com leveduras de *P. brasiliensis* ou injetados com células dendríticas derivadas de medula óssea pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*.

4.7. Migração de DCs pulmonares para linfonodos torácicos após 12 horas de infecção com leveduras de *P. brasiliensis*.

Com o intuito de verificar se DCs pulmonares também possuíam a capacidade de migrar para os linfonodos torácicos após infecção com *P. brasiliensis* fizemos uma marcação de células pulmonares *in vivo* com CFSE. A mesma foi injetada intratraquealmente em camundongos anestesiados. Após 12 horas de infecção de *P. brasiliensis* em suspensão de CFSE, os linfonodos foram retirados e as células purificadas e marcadas com o anticorpo anti- CD11c-PECy5 (HL3). Como controles foram utilizados camundongos injetados intratraquealmente com DMSO diluído em PBS, e também com solução de CFSE. A injeção de CFSE não induziu grande migração, enquanto nos animais infectados com *P. brasiliensis* verificamos uma migração de DCs para os linfonodos, evidenciado pelo encontro de células CFSE⁺/CD11c⁺ nesse tecido.

Figura 7. Migração de células CFSE⁺CD11c⁺ para linfonodos torácicos 12 após injeção intratraqueal de leveduras de *P. brasiliensis* em suspensão de CFSE. Células totais de linfonodos torácicos de camundongos BALB/c foram obtidas após 12 h de infecção com 10⁵ leveduras de *P. brasiliensis* contidas em 50 µl de uma suspensão de 8µM de CFSE em PBS. Como controle foram utilizados animais injetados com 50 µl de uma suspensão de 8µM de CFSE em PBS ou 50 µl de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, está descrita nos itens **A** (células totais de linfonodos), **B** (apenas análise de células CFSE⁺) e **C** (análise somente das células CD11c⁺).

5. DISCUSSÃO

A importância das DCs no foco primário da infecção por *P. brasiliensis* é de grande interesse, visto que, DCs 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, pois são altamente especializadas em fagocitar e processar os microrganismos, e posteriormente tornarem-se maduras, interagindo as respostas imunes inata e adaptativa, migrando assim para órgãos linfóides secundários para ativar os linfócitos T “naive” (WICK, 2003). Na ausência de sinais inflamatórios ou infecção, as DCs possuem um fenótipo caracterizado pela baixa expressão de moléculas MHC-II e das moléculas co-estimuladoras. Quando sinais inflamatórios estão presentes ou as DCs são expostas a componentes derivados de patógenos, seu fenótipo sofre uma alteração significativa, com aumento na expressão de MHC-II e moléculas co-estimuladoras (GUERMONPREZ et al., 2002).

Neste trabalho, foi demonstrado como a infecção por *P. brasiliensis* afeta a população de DCs pulmonares quanto à expressão de moléculas de superfície à capacidade de migração. Nós observamos um significativo aumento dessas células no lavado broncoalveolar após 24 horas de infecção. A caracterização dessas células mostrou que elas expressam CD11c e DEC-205. No tecido pulmonar, no entanto, as células CD11c permaneceram em igual número tanto em 4 quanto em 24 h de infecção. Essas células, porém apresentam grande expressão das moléculas DEC-205 e MHC-II no maior tempo de infecção.

As DCs podem ser subdivididas em diferentes subpopulações, que possuem como característica fenotípica comum a expressão da molécula CD11c. Estudos têm demonstrado que CD11c é um alvo extremamente efetivo na geração de resposta por anticorpos *in vivo*, e tem sido usado como um alvo para respostas por CTL. Devido ao seu padrão de expressão, CD11c pode também fornecer um alvo eficaz para a entrega de antígenos a DCs tanto para a geração de imunidade mediada por células por linfócitos TCD4 e CD8 (CASTRO et al., 2008).

A internalização de microrganismos por DCs 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; GORDON, 2003). Nosso trabalho mostrou um aumento na expressão de DEC-205 (CD205) nas células pulmonares após a infecção. Este receptor foi identificado pela primeira vez em camundongos e é responsável por captação e processamento de antígeno (JIANG et al., 1995). A especificidade do ligante CD205 permanece desconhecida. No entanto, o papel funcional do CD205 como um receptor endocítico tornou-se mais evidente com base na identificação de uma cauda citoplasmática de *motif* de aminoácidos, os quais endocitam eficientemente seu alvo para então levar ao compartimento endossomo/MHC-II (MAHNKE et al., 2000). Sabe-se que este receptor é expresso em DCs imaturas, e que sua expressão aumenta com a maturação da célula (VERMAELEN et al., 2001), o que justifica, em nosso trabalho, o aumento de sua expressão em animais infectados. Wolf et al. (2007), em modelo de infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), mostrou que após 21 dias de infecção 53% das bactérias encontradas estavam no interior de células DEC-205⁺, número que aumentou para 63% após 28 dias de infecção. Quando antígenos são direcionados ao CD205 *in vivo* pela conjugação de um anticorpo monoclonal dirigidos a esse receptor, sua apresentação é significativamente reforçada. Na ausência de outros sinais ativação, este processo leva a tolerância imunológica. CD205 tornou-se um alvo atrativo em modelos de terapia antigênica em doenças auto-imunes assim como estratégia de vacinação em infecções e tumores (BOSCARDIN et al., 2006; TRUMPFHELLER et al., 2006).

Para melhor caracterização das células CD11c⁺ presentes nos pulmões após infecção com leveduras de *P. brasiliensis*, os camundongos foram infectados e as células analisadas 12 e 24 horas após a infecção intra-traqueal. Nesse experimento verificamos que após 12 horas há uma diminuição das células CD11c⁺ no tecido pulmonar digerido, e que este número começa a aumentar após 24 h de infecção em relação ao período de 12 h. Porém ao analisarmos somente as células CD11c⁺ do tecido pulmonar quanto a expressão das moléculas CCR7, CD103, DC-SIGN e CD80, verificamos um aumento de CCR7, CD103 e CD80 após a infecção em relação a seus controles. CCR7 está presente em DCs e têm sua expressão aumentada durante a maturação dessas células, seus ligantes estão presentes em células epiteliais do vaso linfático e nos linfonodos (CCL19 e CCL21), por isso sua importância no processo de migração das DCs durante a infecção. Camundongos deficientes em CCL19 e CCL21 quando infectados com *M. tuberculosis*, recrutaram

95% menos células CD11c^{high}CD11b^{high} para os linfonodos mediastinais que camundongos selvagens. O número de macrófagos e DCs nos pulmões não diferiram nesse mesmo período (WOLF et al., 2007). Hartigan et al. (2009), no entanto, estudando um modelo de aspergilose invasiva em camundongos neutropênicos, verificou que os animais CCR7^{-/-} eram menos susceptíveis a morte, e que após 48 horas de infecção com conídios de *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) esses animais tiveram uma menor expressão de IL-12p35, TNF- α , IL-17 α , IFN- γ e IL-10 quando comparados aos animais selvagens, mas semelhante produção da citocina antiinflamatória IL-10. Também mostraram que o número de DCs mielóides é maior nos pulmões dos animais CCR7^{-/-} sugerindo que a proteção nos animais “Knockout” se dá por uma resposta inflamatória regulada apropriadamente, levando a uma rápida eliminação do *A. fumigatus*.

Nossos resultados demonstraram ainda que camundongos injetados com DCs pulsadas com *P. brasiliensis*, apresentam após 12 horas de infecção, aumento de células CD11c⁺ nos linfonodos, e nesse mesmo período há uma diminuição dessas células nos pulmões. Após 24 horas, as células parecem voltar ao sítio de infecção e diminuem nos linfonodos. As células injetadas não expressam DEC-205, assim como as células encontradas nos linfonodos. Esses resultados sugerem que apenas as células DEC-205⁺ migraram para os linfonodos. A injeção de DCs induziu um aumento na expressão de DEC-205⁺, entretanto estas células permaneceram nos pulmões.

Para comprovar a migração de DCs do sítio de infecção para os linfonodos, as células geradas a partir de células de medula óssea, foram marcadas com CFSE e injetadas intratraquealmente depois de serem pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 12 horas de infecção foi verificada a presença dessas células CFSE⁺ nos linfonodos torácicos e as mesmas expressavam altos níveis de CD11c e MHC-II. Dados semelhantes foram encontrados relacionando as DCs com outros microrganismos. Bar-Haim et al. (2008), estudando a relação entre DC e a disseminação de *Francisella tularensis* verificou um aumento no número de DCs 24 horas após infecção, indicando a ocorrência de um rápido recrutamento dessas células para os linfonodos mediastinais. Eles sugerem que *F. tularensis* pode habitar DCs *in vivo*, e a migração pode estar desempenhando o papel na disseminação e invasividade do patógeno. Estudo envolvendo vírus influenza mostrou que em camundongos controle havia uma migração de células CFSE⁺CD11c⁺ do trato

respiratório para linfonodos peribronquiais, que representavam 1 a 3% da população total de células desse tecido. Entretanto, em animais infectados com o vírus Influenza, havia um acúmulo acelerado dessas células nos linfonodos, visto já após 6 horas de infecção, chegando ao máximo no tempo de 18 horas e apesar do estímulo inflamatório produzido pelo vírus ainda persistir, houve uma rápida diminuição na migração de DCs respiratórias para esses linfonodos após 18 horas de infecção e após 48 horas o número é próximo ao de animais controle (LEEGER; BRACIALE, 2003).

Sabendo que as DCs diferenciadas a partir de células de medula óssea podem diferir quanto ao fenótipo e atividade das DCs residentes no pulmão, as células pulmonares também foram marcadas *in vivo* injetando-se intratraquealmente o corante CFSE juntamente com leveduras de *P. brasiliensis*. Verificamos que após 12 horas, as DCs pulmonares, dos animais infectados com o fungo, migraram para os linfonodos regionais. Lukens et al. (2009), marcando as células pulmonares *in vivo* com CFSE, mostraram que após infecção intranasal com RSV (Respiratory syncytial virus), há um acúmulo de DCs CFSE⁺ nos linfonodos até 36 horas de infecção, e que esse número começa a declinar após esse período. Isso pode ocorrer porque células provenientes de outros tecidos que não o pulmão podem migrar para os linfonodos além de células que chegaram ao pulmão após a injeção de CFSE, não estando dessa forma marcadas.

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 controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER; COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta de células CD4⁺ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo. A fim de verificar o perfil de citocinas induzidas por essas células, um ensaio de linfoproliferação foi realizado com células totais de linfonodos obtidos após 12 h de injeção de DCs pulsadas com leveduras, e reestimuladas *in vitro* com 2 µg/ml de CFA. Nossos resultados mostraram um aumento na porcentagem de células CD4⁺/IL-10⁺ e CD4⁺/IL-17⁺ entre os linfócitos TCD4⁺ que proliferaram após 12 horas de injeção, quando re-estimulados com o antígeno de *P. brasiliensis*, em relação às células que não foram re-estimuladas e também a produção basal de camundongos controle (injetados somente com PBS). Porém, em relação ao número de linfócitos

TCD4⁺ que proliferaram, houve uma diminuição em animais injetados com DC pulsadas em relação aos animais injetados somente com PBS. Isso ocorreu, provavelmente, porque o ensaio foi apenas de 12 horas, não havendo ainda uma sensibilização eficiente dos linfócitos.

Dessa forma, um ensaio foi feito utilizando um tempo de 5 dias de infecção, para determinação de células CD4⁺/IFN- γ ⁺ e CD4⁺/IL-10⁺, CD4⁺/IL-17⁺. O número de células CD4⁺/IL-17⁺ em todos os grupos foi muito pequeno, o que pode ter sido ocasionado pelo tempo de infecção, ou protocolo utilizado nesse ensaio. Quando os animais foram infectados com *P. brasiliensis*, verificamos um aumento no número de células CD4⁺/IFN- γ ⁺ e diminuição nas células CD4⁺/IL-10⁺ nos pulmões após 5 dias. Já nos linfonodos desses animais verificamos aumento nas duas populações de células em questão, não havendo ainda polarização entre Th/Th2. Entretanto, quando as DCs pulsadas foram injetadas, no pulmão houve uma resposta mista, e nos linfonodos houve aumento somente da população de células CD4⁺/IL-10⁺, evidenciando uma tendência de células Th2, mostrando a capacidade das DCs de modularem a resposta imune nessa doença.

Em resumo, verificamos que interações entre *P. brasiliensis* e DCs, geradas de medula óssea, induzem um processo de sinalização levando a migração dessa célula do sítio de infecção para linfonodos e um rápido recrutamento dessas células com alta expressão de MHC-II, CD80, DEC-205, para o pulmão. Esses resultados indicam que DCs geradas de medula assim como DCs residentes no pulmão são capazes de migrar após contato com *P. brasiliensis*, expressando altos níveis de MHC-II, apresentam antígenos e ativam linfócitos T CD4⁺ evidenciada pela produção preferencial de IL-10.

6. CONCLUSÕES

- A infecção com *P. brasiliensis* altera o perfil de DCs pulmonares:
 - ✓ BAL – Aumento de DCs após 24 h, com aumento na expressão de DEC-205.
 - ✓ Pulmão – Aumento de DCs após 24 h, com aumento da expressão de CCR7, CD103 e CD80.
- DCs geradas de medula e pulsadas com *P. brasiliensis* migram para linfonodos torácicos.
- DCs residentes do pulmão migram para linfonodos torácicos após infecção com *P. brasiliensis*.
- Em relação ao perfil de linfócitos T CD4, após infecção com *P. brasiliensis*:
 - ✓ Pulmão: há uma tendência a resposta Th1;
 - ✓ Linfonodos: há uma resposta Th1/Th2;
- Após injeção de DCs pulsadas com *P. brasiliensis*:
 - ✓ Pulmão: há uma resposta Th1/Th2;
 - ✓ Linfonodos: a resposta é predominantemente Th2;

Em resumo, DCs geradas de medula assim como DCs residentes no pulmão são capazes de migrar após contato com *P. brasiliensis*, expressando altos de níveis de MHC-II, e apresentam antígenos a linfócitos T evidenciada pela produção preferencial de IL-10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S.S.; REDDICK, R.L.; SATO, N.; MONTALBO, E.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; DOLAN, M.J.; MELBY, P.C.; AHUJA, S.K. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. **Journal of Immunology**, v.163, p.3890-3897, 1999.

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.529-537, 2001.

ANDREOTTI, P.F.; DA SILVA, J.L.M.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A.; BERNARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANNINI, M.S.J. Isolation and partial characterization of a 30kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v.7, p.875-881, 2005.

BAR-HAIM, E.; GAT, O.; MARKEL, G.; COHEN, H.; SHAFFERMAN, A.; VELAN, B. Interrelationship between dendritic cell trafficking and *Francisella tularensis* dissemination following airway infection. **PLoS Pathogens**, v.4, n.11, 2008.

BHATT, K.; HICKMAN, S.P.; SALGAME, P. A new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. **Journal of Immunology**, v.172, p.2748-2751, 2004.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M.J.; CHAMMA, L.G.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; MOTA, N.G.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.5, p.617-621, 1984.

BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAIOORDANOU, P.M.; GOUVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.3, p.390-394, 1999.

BOSCARDIN, S.B.; HAFALLA, J.C.R.; MASILAMANI, R.F.; KAMPHORST, A.O.; ZEBROSKI, H.A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R.M.;

NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, M.C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.3, p.599-606, 2006.

BOZZA, F. A.; GOMES, R. N.; JAPIASSU, A. M.; SOARES, M.; CASTRO-FARIANETO, HUGO C; BOZZA, P. T.; BOZZA, M. T. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. **Shock** (Augusta), v. 22, n. 4, p. 309-313, 2004.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BROWN, G.D.; GORDON, S. ungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v.19, p.311-315, 2003.

BRUMMER, L.; CASTANEDA, F.; RESTREPO, A.A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p.89-117, 1993.

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGUER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v.66, p.585-594, 1985.

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-resistance to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 10, Barcelona, 1988. **Proceedings**. Barcellona, p.154-159, 1988.

CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.615-623, 1998.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2377-2381, 1994.

CASTAÑEDA, E.; BRUMER, E.; PERLMAN, A.M.; MCEVENS, J.; STEVENS, D.A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the

effect of siderophores. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.26, p.352-358, 1988.

CASTRO, F.V.V.; TUTT, A.L.; WHITE, A.L.; TEELING, J.L.; JAMES, S.; FRENCH, R.R.; GLENNIE, M.J. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. **European Journal of Immunology**, v.38, p.2263–2273, 2008.

CLEMONS, K.V.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.1607-1617, 1989.

COEHAND, L.; ISLER, P.; SONGEON, F.; NICOD, L. P. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.21, n.5, p.547-554, 1999.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, p.1441-1454, 2002.

DEN HAAN, J.M.M.; LEHAR, S.M.; BEVAN, M.J. CD8 (+) but not CD8 (-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.12, p.1685-1696, 2000.

DIEU, M.C.; VANBERVLIET, B.; VICARI, A.; BRIDON, J.M.; OLDHAM, E.; AIT-YAHIA, S.; BRIERE, F.; ZLOTNIK, A.; LEBECQUE, S.; CAUX, C. Selective recruitment of immature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **Journal of Experimental Medicine**, v.188, p.373-386, 1998.

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-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. **Journal of Immunology**, v.155, p.1725-1736, 1995.

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. **Journal of Immunology**, v.157, p.541-548, 1996.

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. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, p.290-297, 2003.

FERREIRA, K.S.; BASTOS, K.R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S.R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cell induces interleukin-10 production and toll-like receptor 2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, v.196, p.1108-1115, 2007.

FIGDOR, C.G.; VAN KOOYK, Y.; ADEMA, G.J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.2, p.77-84, 2002.

FÖSTER, R.; DAVALOS-MISLITZ, A.C.; ROT, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.362-371, 2008.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, p.5-18, 1986.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.20, p.129-132, 1987.

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. **Journal of Immunology** v.166, p.346-352, 2001.

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**, v.58, p.63-70, 1976.

GONZALEZ-JUARRERO, M.; ORME, M.I. Characterization of murine lung dendritic cell infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v.69, p.1127, 2001.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITCOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENAS, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.621-667, 2002.

GUO, M.; GONG, S.C.; MARIC, S.; MISULOVIN, Z.; PACK, M.; MAHNKE, K.; NUSSENZWEIG, M.C.; STEINMAN, R.M. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. **Human Immunology**, v.61, n.8, p.729-738, 2000.

HERZENBERG, L.A.; TUNG, J.; MOORE, W.A.; HERZENBERG, L.A.; PARKS, D.R. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. **Nature Immunology**, v.7, p.681-685, 2006.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v.176, n.6, p.1693-1702, 1992.

INABA, K.; SWIGGARD, W.J.; INABA, M.; MELTZER, J.; MIRZA, A.; SASAGAWA, T.; NUSSENZWEIG, M.C.; STEINMAN, R.M. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. **Cellular Immunology**, v.163, n.1, p.148-156, 1995.

INGULI, E.; MONDIRO, A.; KHORUTD, A.; JENKINS, M.K. *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4 (+) T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, p.133-142, 1997.

JACOBS, B.; WUTTKE, M.; PAPEWALIS, C.; SEISSLER, J.; SCHOTT, M.; Dendritic Cell Subtypes and *In Vitro* Generation of Dendritic Cells. *Horm Metab Res* 2008 ; 40: 99 – 107

JIANG, W.; SWIGGARD, W.J.; HEUFLER, C.; PENG, M.; MIRZA, A.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cell is involved in antigens processing. **Nature**, v.375, n.6527, p.151-155, 1995.

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

KENETSUDA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v.110, n.1, p.208-218, 1972.

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 paracoccidioidinopositivos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.1, p.245-259, 1959.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G., eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.1-11.

LEGGE, K.L.; BRACIALE, T.J. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. **Immunity**, v.18, p.265-277, 2003.

LINEHAN, S.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; STAHL, P.D.; GORDON, S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: *in situ* expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.12, p.1961-1972, 1999.

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*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, p.7659-7663, 1983.

LUKENS, M.V.; KRUIJSEN, D.; COENJAERTS, E.J.; KIMPEN, J.L.L.; VAN BLEEK, G.M. Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node. **Journal of Virology**, v.83 (14), p.7235-7243, 2009.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. **Brasil-Médico**, v.22, p.121-124, 1908.

MAHNKE, K.; GUO, M.; LEE, S.; SEPULVEDA, H. SWAIN, S.L. NUSSENZWEIG, M.; STEINMAN, R.M. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. **Journal of Cell Biology** v.151, n.3, p.673-683, 2000.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 25, n.3, p.165-175, 1987.

MOLL, H.; BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniosis. **Immunobiology**, v.204, n.5, p.659-666, 2001.

NORBURY, C.C.; MALIDE, D.; GIBBS, J.S.; BENNINK, J.R.; YEWDELL, J.W. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells *in vivo*. **Nature Immunology**, v.3, p.265-271, 2002.

PRADO, M.; SILVA, M.B; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103 (3), p.513-521, 2009.

PINZAN, C.F.; RUAS, L.P.;CASABONA-FORTUNATO, A.S.; CARVALHO,F.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Immunological basis for gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLos One**, v.5, e10757, 2010.

POLLARD, A.M.; LIPSCOMB, M.F. Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.172, p.159, 1990.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1610-1615, 1991.

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.132-137, 1972.

RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.138-144, 1974.

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 resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.26, p.346-345, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Saboraudia**, v.23, p.323-324, 1985.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**, v.45, p.194-205, 2001.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; SETEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.56, p.711-713, 1988.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annual Review of Immunology**, v.10, p.385-398, 1992.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews Immunology**, v.2 (3), p.151-161, 2002.

SHORTMAN, K.; NAIK, S.H. Steady-state and inflammatory dendritic cell development. **Nature Reviews Immunology**, v.7 (1), p.19-30, 2007

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. **Medical Mycology**, v.36, p.37-42, 1998.

SPLENDRE, A. A Zymonematozi com localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de Sés Filiales**, v.5, p.313-319, 1912.

STEFANOVA, I.; DORFMAN, J.R.; GERMAN, R.N. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naïve T lymphocytes. **Nature**, v.420, p.429-439, 2002.

STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **Journal of Experimental Medicine**, v.137, n.5, p.1142-1162, 1973.

SWIGGARD, W.J.; MIRZA, A.; NUSSENZWEIG, M.C.; STEINMAN, R.M. DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Cellular Immunology**, v.165, n.2, p.302-311, 1995.

TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.S.; LOPEZ, C.B.; MORAN, T.M.; MOLTEDO, B.; SOARES, H.; HUANG, Y.X.; SCHLESINGER, S.J.; PARK, C.G.; NUSSENZWEIG, M.C.; GRANELLI-PIPERNO, A.; STEINMAN, R.M. Intensified and protective CD4(+) T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.3, p.607-617, 2006.

UNANUE, E.R.; ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v.236, p.551-557, 1987.

VAN STRIPDONK, M.J.; HARDENBERG, G.; BICKER, M.S.; LEMMENS, E.E.; DNOIN, N.M.; GREEN, D.R.; SCHOENBERGER, S.P. Dynamic programming of CD8+ lymphocyte responses. **Nature Immunology**, v.4, p.361-365, 2003.

VAN TVELT, L.; ANDRIEU, M.; VERHASSELT, V.; CONNAN, F.; CHOPPIN, J.; VERCRUYSSSE, V.; GOLDMAN, M.; HOSMALIN, A.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8+ T lymphocytes. **International Immunology**, v.14, n.10, p.1135-1144, 2002.

VERMAELEN, K.Y.; CARRO-MUINO, I.; LAMBRECHT, B.N.; PAUWELS, R.A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. **Journal of Experimental Medicine**, v.193, 51-60, 2001.

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

WILLMENT, J.A.; BROWN, G.D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends in Microbiology**, v.16, p.27-32, 2007.

WOLF, A.J.; LINAS, B.; TREVEJO-NUÑEZ, G.; KINCAID, E.; TAMURA, T.; TAKATSU, K.; ERNST, J. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v.179, p.2509-2519, 2007.

WITMER-PACK, M.D.; SWIGGARD, W.J.; MIRZA, A.; INABA, K.; STEINMAN, R.M. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. **Cellular Immunology**, v.163, n.1, p.157-162, 1995.

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

ANEXOS