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

Modulação da ativação de células dendríticas por
Paracoccidioides brasiliensis

Karen Spadari Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2003

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

Modulação da ativação de células dendríticas por
Paracoccidioides brasiliensis

Karen Spadari Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2003

Karen Spadari Ferreira

Modulação da ativação de células dendríticas por
Paracoccidioides brasiliensis

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

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

Agradecimentos

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

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

*Obrigada aos meus irmãos **Marcelus, Idineu**
e Fernanda pela amizade e carinho*

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

*Obrigada **Mãe**, minha fortaleza ...*

*Agradeço ao **Fábio**, pela compreensão e por
estar presente em grandes momentos da minha
vida*

*Gostaria particularmente de expressar meus maiores
agradecimentos ao **Professor Doutor Sandro Rogério de
Almeida**, meu orientador, que revisou amplamente este trabalho
e serviu também como crítico igualmente construtivo, contribuindo
com o meu crescimento profissional.*

Agradeço a minha amiga e companheira
Sônia, por ter compartilhado cada passo
deste caminho

*Agradeço aos amigos **Marina, Eliver, Rosana, Edgar, Glória, Andréa, Márcia, Tatiana, Tânia, Viviane e Helena** que generosamente contribuíram com seu tempo e esforço para me auxiliar e tornar este trabalho o mais acurado e útil possível.*

SUMÁRIO

Sumário

I. Abreviaturas	1
II. Resumo	3
III. Abstract	4
IV. Introdução	5
V. Objetivos	19
VI. Materiais e métodos	20
1. Animais	20
2. Fungo	20
3. Produção de exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i>	20
4. Purificação da gp43 de <i>P. brasiliensis</i>	21
5. Pureza do antígeno	21
6. Dosagem de proteínas	21
7. Obtenção e caracterização de células dendríticas	22
8. Ensaio de fagocitose	22
9. Ensaio de fagocitose de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por células dendríticas imaturas obtidas de camundongos A/J e B10.A na presença de manana	23
10. Coloração por Giemsa	23
11. Imunofenotipagem de células dendríticas através de citometria de fluxo	23
12. Interação de células dendríticas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou gp43	24

13.	Indução de resposta imune de linfócitos T “naive” por células dendríticas	25
14.	Ensaio de proliferação celular	25
15.	Ensaio de dosagem de citocinas	25
16.	Ensaio de modulação	26
16.1.	Preparação do inóculo	26
16.2.	Infecção intratraqueal	27
16.3.	Imunizações	27
17.	Unidades formadoras de colônias	28
18.	Análise histopatológica	28
19.	Análise estatística	28
VII.	Resultados	29
1.	Caracterização fenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo	29
2.	Ensaio de fagocitose	30
3.	Ensaio de fagocitose de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por células dendríticas imaturas obtidas de camundongos A/J e B10.A na presença de manana	32
4.	Expressão de moléculas de superfície de células dendríticas obtidas de camundongos A/J e B10.A imaturas ou ativadas com LPS na presença de <i>P. brasiliensis</i>	34
5.	Expressão de moléculas de superfície de células dendríticas de camundongos A/J e B10.A imaturas ou ativadas com LPS de na presença de gp43	37
6.	Indução de resposta imune de linfócitos T “naive” por células dendríticas estimuladas com gp43	40

7.	Secreção de IL-12 por células dendríticas obtidas de camundongos A/J e B10.A imaturas ou ativadas com LPS	42
8.	Modulação da resposta imune por células dendríticas <i>in vivo</i> em camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	45
VII.	Discussão	49
VIII.	Conclusões	59
IX.	Anexos	61
X.	Referências Bibliográficas	65

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno

BHI – “Bacto-Brain Heart Infusion”

BSA – Albumina de Soro Bovino

B7.1 – CD80

B7.2 – CD86

CBB – “Coomassie Brilliant Blue”

CD – “Cluster of Differentiation”

Células NK – Células Natural Killer

DO – Densidade Óptica

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

e.v. – Endovenosa

Fc – Fragmento constante da molécula de imunoglobulina

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos

gp – Glicoproteína

IFN- γ - Interferon-gama

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

I.t. – Intratraqueal

kDa – kiloDalton

LPS – Lipopolissacarídeo

MELISA – “Magnetic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIF – Média de Intensidade de Fluorescência

NF- κ B – Fator Nuclear NF- κ B

ODN – Oligonucleotídeo

OPD – Orthophenylenediamine

PBS – Solução Salina de Fosfato Tamponada

P. brasiliensis – *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM – Paracoccidioidomicose

PE – Ficoeritrina

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

SBF – Soro Fetal Bovino

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio

TCR – Receptor de Células T

TGF- β - Fator β de Crescimento

Th – Linfócito T auxiliar

TLR – “Toll Like Receptor”

TNF- α - Fator α de Necrose Tumoral

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

YPD – “Yeast Extract, Casein Peptone, D-glucose”

RESUMO

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, causada pelo fungo dimórfico térmico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), cujo principal componente antigênico é a glicoproteína de 43 kDa (gp43). Diferentes formas clínicas podem ser desenvolvidas e estão diretamente associadas com vários graus de depressão da resposta imune celular.

Considerando a importância das células dendríticas na interação dos sistemas imune inato e adaptativo, e na ativação de células T “naive”, no presente trabalho estudamos se células dendríticas interagem com leveduras de *P. brasiliensis*, assim como seu principal componente antigênico (gp43). Foi demonstrado pela primeira vez que células dendríticas poderiam ser infectadas por leveduras de *P. brasiliensis*, e esse fungo permaneceu viável após fagocitose. Analisamos por citometria de fluxo a expressão das moléculas de superfície observando diminuição significativa da expressão das moléculas de MHC-II, CD80 e CD54 em células dendríticas quando estas foram incubadas com leveduras da cepa Pb18 ou com gp43. Esse resultado mostrou que a ação do *P. brasiliensis* em células dendríticas poderia ser mediada pela gp43. Ao analisarmos a síntese de IL-12, observamos diminuição significativa desta interleucina, quando células dendríticas ativadas com LPS, foram cultivadas na presença de leveduras de *P. brasiliensis* ou gp43. Esses resultados sugerem que a gp43 pode afetar várias funções das células hospedeiras, indicando que esta inibição pode ser usada pelo *P. brasiliensis* para reduzir a eficiência da resposta imune, facilitando assim o estabelecimento da infecção primária em indivíduos suscetíveis.

ABSTRACT

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis, endemic in Latin America, is a progressive systemic mycosis caused by dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, where the major antigenic component is a glycoprotein of 43kDa (gp43). The infection can evolve to different clinical forms that are associated to various degrees of suppressed cell-mediated immunity. The role of dendritic cells (DCs) in *P. brasiliensis* infection has never been investigated. With the recognition that DCs are able to initiate response in naïve T cells and that they also participate in Th cell education the present study was undertaken to understand whether DCs interact with *P. brasiliensis* or gp43, as well as to elucidate possible mechanisms and consequences of this interaction. In the present report, it was demonstrated for the first time that DCs could be infected by *P. brasiliensis* and survive. Our results indicate that *P. brasiliensis* infection and purified gp43 lead to down-regulation of MHC-II and adhesion properties of immature DCs. The down-regulation was also observed in LPS-induced DCs maturation, where the expression of MHC-II, CD80, CD54 and CD40 were significantly inhibited in the presence of *P. brasiliensis* or gp43. These data show that the actions of *P. brasiliensis* on DCs could be mediated by gp43. In addition, an inhibition of IL-12 production by gp43 was observed in LPS-induced DC maturation. These results suggest that gp43 affects many functions of the host cells, indicating that this inhibition might be used by *P. brasiliensis* to reduce the effectiveness of the immune response, thus facilitating the establishment and fate of primary infection in susceptible host.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de natureza profunda e granulomatosa, que compromete preferencialmente o tecido pulmonar, o sistema linfático, o tecido mucocutâneo e, por contiguidade, 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. Desde então, esta patologia tem recebido várias denominações, mas somente em 1930, ALMEIDA cria o gênero *Paracoccidioides*, denominando assim, o agente causador desta micose como *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*).

Geograficamente está restrita a países da América Latina como Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (FRANCO *et al.*, 1987 e RESTREPO, 1990), sendo a micose sistêmica mais comum no Brasil (WANKE & LONDERO, 1994).

O agente etiológico da PCM é um fungo dimórfico, e as condições que favorecem o dimorfismo deste fungo seriam variações térmicas, balanço nutricional e umidade relativa (MACKINNON, 1960; NEGRONI, 1968; BORELLI, 1972; PADILHA-GONÇALVES, 1972; RESTREPO, 1985; CONTI-DIAZ & RILLA, 1989).

P. brasiliensis é conhecido apenas na sua forma assexuada, saprobiota do solo (ALMEIDA, 1930). Quanto às características morfológicas, o fungo se apresenta sob a forma de levedura quando cultivado à 37°C ou em vida parasitária, e no exame direto, pode-se verificar a presença de células ovaladas (com 1-30µm de diâmetro) (LACAZ, *et al.*, 1991) ou multibrotantes, com aspecto de “roda de leme”. Em vida saprofítica ou quando cultivado a 25°C, o *P. brasiliensis* apresenta-se sob a forma de micélio, com hifas hialinas delgadas e septadas.

Estudos que caracterizam as áreas de maior prevalência da PCM mostram que esta é encontrada em locais de floresta úmida - tropicais e subtropicais, com temperaturas variando entre 17 e 24°C, Índices

pluviométricos elevados (800-2.000 mm por ano) e com altitude média de 47 a 1.300 m, regiões com o inverno curto, grandes rios e verões chuvosos (RESTREPO, 1985).

Os aspectos epidemiológicos da PCM não estão bem definidos. Alguns autores acreditam que a micose é responsável pelos elevados índices de mortalidade em áreas rurais da América Latina. Entretanto, vários estudos relatam sua ocorrência em trabalhadores de áreas industriais e em crianças que residem em regiões urbanas (GREER e RESTREPO, 1977; BLOTTA *et al.*, 1999 e DEL NEGRO *et al.*, 1994). Atualmente acredita-se que as crianças representam em geral, 5% dos casos relatados desta micose (BLOTTA *et al.*, 1999).

Coutinho *et al.* em 2002, publicaram um estudo sobre 3.181 óbitos por PCM no Brasil entre 1980 e 1995. Neste período a micose destacou-se como oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica, entre as patologias infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa média de mortalidade anual foi de 1,45 casos por milhão de habitantes, e a região Centro-Oeste apresentou o segundo coeficiente mais elevado do País. A doença prevaleceu como endemia nas áreas rurais, e a taxa de mortalidade predominou em indivíduos do sexo masculino, atingindo 84,75% dos óbitos.

Em áreas classificadas como sendo de alta endemicidade, o índice anual é estimado em 3 casos por 100.000 habitantes (LONDERO & RAMOS, 1990).

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 1 mulher em áreas endêmicas (LACAZ *et al.*, 1994). Estudos sugerem que nas mulheres os hormônios femininos conferem uma proteção natural contra esta patologia. O tratamento de *P. brasiliensis* com altas concentrações de hormônio feminino (estrogênio) bloqueia a transição da fase miceliana (forma infectante do fungo) para a leveduriforme (forma parasitária) (LOOSE *et al.*, 1983; RESTREPO *et al.*, 1984; SALAZAR *et al.*, 1988 e CLEMONS *et al.*, 1989). Estes dados sugerem que a resistência das

mulheres no estágio inicial da infecção seja atribuída a estes efeitos hormonais (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

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

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

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

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

No Brasil, SILVA-VERGARA *et al.*, (1998) isolaram o fungo a partir do solo coletado na entrada de uma toca de tatu em um cafezal, na região de Ibiá, Minas Gerais. Posteriormente, outras três cepas foram isoladas a partir de tatus na mesma região (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000). BAGAGLI *et al.*, (1998) em Botucatu, SILVA-VERGARA *et al.*, (1998) e MACEDO *et al.*, (1998) na Serra da Mesa em Goiás confirmaram a presença de *P. brasiliensis* em tatus através de exame histopatológico nas diferentes regiões do Brasil. Com esses relatos, fica claro a dificuldade de se localizar com precisão o *habitat* natural do fungo.

No homem, várias portas de entrada têm sido sugeridas para o *P. brasiliensis*, incluindo pele, mucosas, trato gastrointestinal e pulmões. No entanto, dados experimentais e clínicos suportam a via inalatória como a principal porta de entrada deste fungo no hospedeiro humano (McEWEN, 1997).

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

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

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

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

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

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

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

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

De acordo com as distintas reações imunológicas que ocorrem na PCM, os pacientes infectados foram classificados em duas formas polares: pólo hiperérgico, que se apresenta como uma forma benigna da doença, ou seja, o paciente apresenta infecção localizada, resposta imune celular preservada, baixos títulos de anticorpos, granulomas epitelióides compactos, contendo poucos fungos viáveis, e pólo anérgico, que se apresenta como

uma forma maligna da micose, e os pacientes apresentam disseminação da infecção, resposta celular deprimida, altos níveis de anticorpos, granulomas epitelióides frouxos e supurativos, com extensas áreas necróticas e abundante o número de células viáveis do fungo (LACAZ *et al.*, 1982).

Laboratorialmente, a PCM é diagnosticada empregando-se métodos diretos e indiretos (sorológico). No entanto, o diagnóstico de certeza da PCM baseia-se no achado de leveduras com múltiplos brotamentos, birrefringentes, no material clínico (secreções, raspados de lesão, escarro, lavado brônquico, lavado broncoalveolar, pús e biópsia de tecidos mucocutâneos) e no seu isolamento em cultura. Após a identificação o fungo pode ser cultivado em meios de cultura sintéticos ou então, inoculados em animais de laboratório para posterior retrocultivo (BRUMMER *et al.*, 1993; LACAZ, 1994).

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

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

Em 1977, YARZABAL *et al.* verificaram que os antígenos liberados no sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* formavam uma banda específica frente a soros de pacientes com PCM em teste de imunoeletoforese. Esta banda, denominada banda E, mostrou-se de importância diagnóstica pela especificidade e frequência com que ocorre em soros de pacientes com PCM. Verificou-se, posteriormente, que a banda E era composta por dois componentes, E1 e E2. O antígeno E1, com atividade de fosfatase alcalina

era revelado de forma variável, enquanto que o antígeno E2 podia ser visto na imunoeletroforese como sendo específico da PCM. A utilização deste antígeno E2, em imunodifusão, permitiu identificar reações específicas com soros de pacientes com PCM.

Em 1986, PUCCIA *et al.* investigaram a natureza do antígeno E2. Utilizando filtrados de cultura e cromatografia em coluna de gel filtração, obtiveram três frações (F1, F2 e F3), sendo que apenas a fração F1 mostrou-se imunorreativa em imunodifusão. Esta fração apresentou afinidade para a concanavalina A e, quando eluída desta lectina, imobilizada em coluna de Sepharose e analisada em SDS-PAGE, revelou quatro componentes de 43, 55 e 70 kDa e, um componente de alto peso molecular, com migração difusa. Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM (PUCCIA *et al.*, 1991) demonstraram que apenas a glicoproteína com 43 kDa (gp43) era imunoprecipitada por 100% dos soros de PCM e não reagia com soros de pacientes não infectados. Posteriormente, verificou-se que a gp43 era o principal componente antigênico presente nas frações anteriormente descritas por RESTREPO & MONCADA, (1974) e YARZABAL *et al.* (1977). Desde então, este componente antigênico do fungo, considerado um marcador sorológico da PCM, vem sendo utilizado no sentido de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos (CAMARGO *et al.*, 1994).

VICENTINI *et al.* (1994), estudando a interação de componentes da matriz extracelular com *P. brasiliensis*, demonstraram que laminina liga-se de forma específica a células leveduriformes de *P. brasiliensis*, aumentando, *in vitro*, a adesão das células fúngicas à monocamada de células epiteliais de rim de cão de forma dose-dependente. Foi demonstrado também, que a gp43, presente na superfície do fungo, era o principal ligante de laminina de forma específica e saturável. A capacidade da gp43 de se ligar a laminina, deve favorecer a invasão e destruição de tecidos infectados.

Diversos modelos experimentais foram propostos para avaliar a relação parasito-hospedeiro durante a infecção pelo *P. brasiliensis*. Os modelos experimentais em diferentes espécies animais têm contribuído para

o estudo da resposta imune no hospedeiro a esta infecção (MOSCARDI & FRANCO 1980).

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

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

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

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

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante, pois, certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo

celular (Th1) e outros, mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER & COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta de células T CD4⁺ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo.

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

Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com as APCs (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos), proliferem e se diferenciem em células efectoras, pois, embora os linfócitos T reconheçam antígenos com alta especificidade, eles não são capazes de iniciar uma resposta imune (Th1/Th2) (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU *et al.*, 2000 e LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2001).

As células dendríticas foram descritas em 1973 por STEINMAN e COHN e desde então, tem interessado os pesquisadores de todo o mundo por serem capazes de determinar a especificidade e natureza da resposta imune (Th1/Th2). As células dendríticas são apresentadoras de antígenos capazes de fazer 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”, tornando-as células apresentadoras de antígenos “profissionais” (WICK, 2003). Além de serem eficientes na captura do antígeno, são capazes de processá-los e apresentar seus peptídeos via MHC-II aos linfócitos T “naive” (UNANUE & ALLEN, 1987).

Células dendríticas estão localizadas nos sítios de exposição de antígenos, como a mucosa e tecidos periféricos. Os precursores destas células originam-se na medula óssea e constantemente migram para diversos tecidos, tais como pele (onde são denominadas de células de Langerhans), sistema gastrointestinal, respiratório, sangue e linfa. Nos tecidos periféricos, essas células são ineficientes na apresentação do

antígeno e na ativação de células T, pois possuem fenótipo imaturo (GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Células dendríticas imaturas apresentam baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas MHC de classe I e II (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998 e GUERMONPREZ, *et al.*, 2002), mas possuem grande capacidade fagocítica.

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

Os receptores de superfície relatados como responsáveis pela ativação e maturação das células dendríticas são: receptores "Toll-like" (TLR), receptores de citocinas, receptores de TNF (TNF-R) e receptores para a porção Fc. Atualmente, sabe-se que células dendríticas de camundongos expressam receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcR): Fc γ RI (CD64), Fc γ RIII e Fc γ RII (CD32) (ESPOSITO-FARESE *et al.*, 1995 e FANGER *et al.*, 1996). Em humanos, células dendríticas derivadas de monócitos expressam principalmente FcR γ II (CD32) e Fc α R (CD89) (GEISSMANN, *et al.*, 2001). Além de expressarem FcR γ II, expressam receptores para manose, que são mediadores na captura de complexos antígeno-anticorpo e antígenos com grande quantidade de manose ou fucose, respectivamente (MANCA *et al.* 1991). Células dendríticas podem apresentar antígenos que possuem manose em sua constituição demonstrando uma eficiência de 100 a 1000 vezes maior em relação aos antígenos que não apresentam este carboidrato (ENGERING *et al.*, 1997).

A família de receptores, "Toll-like", encontra-se presente tanto nas células dendríticas imaturas como em macrófagos e células endoteliais. A estimulação desses receptores ativam componentes citoplasmáticos da via de sinalização do Fator Nuclear κ B (NF- κ B), o qual, por sua vez, modula a maturação das células dendríticas por um mecanismo ainda não conhecido (KAISHO & AKIRA, 2001).

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

Durante a maturação, as células dendríticas perdem sua capacidade de capturar e processar o antígeno, aumentando a expressão de moléculas de MHC classe II, co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54) e aumentam sua produção de IL-12 (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998 e GUERMONPREZ, *et al.*, 2002). O aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 que se ligam ao CD28 tornam as células dendríticas eficientes ativadoras de células T (GUERMONPREZ, *et al.*, 2002).

Estudos realizados por SHORTMAN & CAUX em 1997, sugerem que existem diferentes populações de células dendríticas, e que em camundongos essas populações diferem no fenótipo, localização e função. Em 2001, SHORTMAN & WU distinguiram as populações de células dendríticas em linfóides e mielóides. Ambas expressam CD11c, MHC II e moléculas co-estimulatórias, no entanto, se distinguem pela presença de moléculas CD8 α , que estão presentes nas células dendríticas linfóides (CD11c+CD8 α +DEC205+CD11b-), e ausentes nas células dendríticas mielóides (CD11c+CD8 α -DEC205-CD11b+) (SHORTMAN & CAUX, 1997; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Atualmente, WAKKACH *et al.*, (2003), descreveram uma subpopulação de células dendríticas, as quais, possuem morfologia de células plasmocíticas e são caracterizadas fenotipicamente

pela expressão das moléculas CD11c^{low}, CD45Rb^{high}, CD80, CD86, MHC-II, DEC205, CD11b, B220⁻ e Gr1⁺.

Estudos *in vitro* sugerem que células dendríticas CD8 α ⁺ desempenham um papel importante na regulação das respostas imunes. Vem sendo sugerida a existência de um sinal adicional que influenciaria a ativação de células dendríticas nos tecidos periféricos e seria fornecido pela natureza do estímulo e/ou por fatores presentes no microambiente. Esse sinal induziria a diferenciação dos linfócitos em Th1 ou Th2. Um dos sinais adicionais propostos são as citocinas presentes no local de maturação das células dendríticas (KALINSKI *et al.*, 1999).

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

Alguns trabalhos sugerem que a polarização de uma resposta para Th1 por células dendríticas CD8 α ⁺ está diretamente relacionada com a habilidade destas células em produzirem maiores quantidades de IL-12. Já células dendríticas CD8 α ⁻ estimulariam preferencialmente um padrão de resposta Th2. Apesar desta diferença, ambas populações de células dendríticas são eficientes em estimular células T CD4⁺ "naive" antígeno-específicas *in vivo* (MALDONADO-LÓPEZ *et al.*, 2001). De forma contrária, um estudo em humanos demonstrou que ambas populações de células dendríticas, mielóides e linfóides, induzem tanto a polarização de células Th1 como Th2, dependendo de seu estágio de maturação (LANGENKAMP *et al.*, 2000). Além de IL-12, as células dendríticas também podem produzir IL-18, IFN- γ e IL-10, sendo que esta última inibe o processo de maturação das mesmas, impedindo a ativação de células T nos órgãos linfóides secundários (DE SMEDT *et al.*, 1997; BANCHEREAU *et al.*, 2000 e LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2000).

AHUJA *et al.* (1999), mostraram que células dendríticas pulsadas com proteínas de *Leishmania donovani* (*L. donovani*) e transferidas adotivamente

para camundongos BALB/c induziram uma resposta antígeno específica do tipo Th1. Esses autores também mostraram que a administração de células dendríticas pulsadas com antígeno, antes ou durante a infecção com *L. donovani*, induziu proteção, diminuindo o número de parasitas nos órgãos infectados, sendo esse efeito mais evidente em células dendríticas transfectadas com genes retrovirais que aumentam a produção de IL-12 biologicamente ativa.

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

TABORDA *et al.* 1998 mostraram que a imunização com gp43 de *P. brasiliensis*, com adjuvante completo de Freund, induziram proteção em camundongos desafiados intra-traquealmente com cepa virulenta de *P. brasiliensis* indicando a possível utilização dessa molécula no desenvolvimento de uma vacina.

Em vários modelos de doenças infecciosas, as células dendríticas vem sendo estudadas por sua capacidade de servir como adjuvante e vacina mediando proteção contra bactérias, vírus, parasitas ou patógenos fúngicos (MOLL & BERBERICH, 2001). Diversos estudos revelam a eficiência de células dendríticas em ensaios de vacinação para: *Candida albicans* (FE D'OSTIANI, *et al.*, 2000) e *L. major* (FLOHÉ, *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, compreendendo-se mais sobre a biologia de células dendríticas e com isso, tem-se dado muita atenção ao desenvolvimento de estratégias de tratamento e vacinação principalmente em câncer e AIDS utilizando-se essas células (STEINMANN, 1996 e LOTZE, 1997). O racional para o uso de células dendríticas como o ponto principal para o desenvolvimento de estratégias de vacinação e imunoterapia baseia-se nas propriedades biológicas dessas células, de possuir os processos de captura, processamento e apresentação de antígenos a linfócitos T "naive",

que são altamente eficientes, resultando em uma resposta imune específica, interagindo os sistemas imune inato e adaptativo.

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

Células dendríticas estão envolvidas diretamente na relação entre patógeno e o sistema imune do hospedeiro. O reconhecimento e ingestão do patógeno e/ou seus constituintes são acompanhados pela ativação/maturação destas células, com aumento das moléculas de MHC-II, coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54), levando na maioria das vezes, uma eficiente resposta imune do hospedeiro, com ativação de células T "naive". No entanto, alguns patógenos têm a capacidade de afetar as funções biológicas das células dendríticas através da inibição de suas moléculas de superfície, bem como da inibição da síntese de citocinas importantes na ativação de linfócitos do tipo Th1. Dessa maneira, é interessante o estudo de células dendríticas frente às leveduras do fungo *P. brasiliensis*, bem como, do seu principal componente antigênico, a gp43, uma vez que nada foi descrito anteriormente na literatura.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Principais objetivos deste trabalho:

- Estudar *in vitro* a interação de células dendríticas de camundongos resistentes e susceptíveis com leveduras de *P. brasiliensis* ou com gp43 analisando a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas liberadas;
- Avaliar a capacidade de células dendríticas em processar e apresentar o componente antigênico gp43 a linfócitos T “naive”;
- Avaliar a capacidade de células dendríticas de camundongos resistentes e suscetíveis, pulsadas com gp43, em modular a resposta imune *in vivo* em camundongos infectados por *P. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Animals

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas das linhagens A/J e B10.A, respectivamente, resistentes e susceptíveis à infecção intratraqueal por *P. brasiliensis*, com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB-USP e criados em condições SPF ("specific pathogens free").

Fungo

Foram utilizadas as cepas B-339 (Micoteca do Laboratório do Dr. Zoilo Pires de Camargo – UNIFESP) para obtenção de exoantígeno para purificação de gp43, e a virulenta Pb 18 (Micoteca do Laboratório da Dra. Vera Calich – USP) (Kashino *et al.*, 1987) do *P. brasiliensis* para infecções intratraqueais. Ambas as cepas foram mantidas em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK – Darmsradt - Alemanha), em estufa a 36°C, com repiques semanais.

Produção de exoantígeno de *P. brasiliensis*

Para obtenção do antígeno bruto as células de *P. brasiliensis* cepa B-339 foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, acrescido de 0,01% de cloreto de tiamina e 0,14% de asparagina, por 3 dias a 35°C. Após este período de cultivo as células fúngicas foram transferidas para 50 mL de meio líquido TOMM modificado (PUCCIA *et al.*, 1991) (6,1g de extrato de levedura, 16,1g de dextrose, 15g de peptona de caseína, 0,31g de K₂HPO₄, 0,31g de K₂H₂PO₄, 0,12g de MgSO₄.7H₂O, 0,006g de MnSO₄.H₂O, 0,006g de NaCl, 0,006g de FeSO₄ para 1000mL de H₂O destilada), em Erlenmeyer de 250 mL (pré-inóculo). Esse pré-inóculo foi cultivado por 3 dias sob agitação, a temperatura de 35°C (C25 Incubador Shaker), sendo então, transferido para frasco tipo Fernbach, de 2800 mL, contendo 450 mL do mesmo meio utilizado no pré-inóculo, e deixado sob agitação e temperatura constante, a 35°C, por mais 7 dias. Após esse período as células foram

mortas com timerosal (0,2g/l) e separadas do fluido por filtração em papel de filtro. O filtrado foi concentrado 10 vezes, dialisado contra água destilada por 48 horas, e armazenado a -20°C .

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

A glicoproteína de 43 kDa, foi purificada a partir de sobrenadante de cultura líquida de *P. brasiliensis* B-339 por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-CNBr 4 (Pharmacia Biotech AB) acoplada ao anticorpo monoclonal anti-gp43 17c, conforme descrito por GESZTESI *et al.* (1996). O exoantígeno foi circulado em fluxo lento pela coluna com auxílio de bomba peristáltica (Bio-Rad Laboratories), ao que se sucedeu a lavagem com PBS (Solução Salina de Fosfato Tamponada) (pH 7,2). A eluição da proteína foi feita com tampão glicina 0,1 M NaCl 0,15M pH 2,8 em tubos contendo tampão Tris HCl 0,1 M pH 9,0. Os elutos foram dialisados de um dia para o outro contra PBS, com substituição deste tampão e diálise por 3 horas adicionais, a 4°C . Posteriormente, o purificado de gp43 foi esterilizado em filtro de $0,22\mu\text{m}$ (Costar – Estados Unidos) e armazenado a -20°C .

Pureza do antígeno

Após a diálise, a proteína teve a pureza avaliada por eletroforese, em gel de poliacrilamina com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados por impregnação com prata, de acordo com ANSORGE (1983).

Dosagem de proteínas

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

Obtenção e caracterização de células dendríticas

Células dendríticas foram obtidas segundo protocolo descrito por INABA *et al.* 1992. Células de medula óssea foram retiradas de fêmur e tíbia de camundongos através de diversas lavagens com PBS-BSA 1%, em seguida as hemácias foram lisadas com tampão hemolítico. As células remanescentes foram cultivadas em meio RPMI contendo 10 % de soro fetal bovino (Cultilab – Campinas, Brasil) e suplementado com GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos) (50 ng/mL) recombinante (Pharmingen) por 7 dias. No 3º e 5º dias as células não aderentes foram removidas (granulócitos e linfócitos) e o meio RPMI com citocina recombinante foi repostado. No 7º dia as células não aderentes, onde se encontram as populações enriquecidas de células dendríticas, foram removidas. A caracterização de células dendríticas foi realizada por meio da análise da expressão dos seguintes marcadores: MHC- classe II, CD40, CD80, CD86, baixa expressão de CD11b além da expressão de seu marcador específico CD11c.

Ensalo de fagocitose

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas em ágar Sabouraud foram coletadas e lavadas três vezes com PBS seguidas de forte agitação em vortex. As células grandes foram sedimentadas espontaneamente e o sobrenadante contendo células pequenas foi recolhido. Para o teste de fagocitose, células dendríticas de ambas linhagens de camundongos foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços e incubadas com as células leveduriformes pequenas durante 4 horas na temperatura de 37°C. O número de células foi ajustado em Câmara de Neubauer, na proporção de 6 leveduras para cada célula dendrítica. As lamínulas foram lavadas com PBS para remover as células de *P. brasiliensis* não fagocitadas e então foram coradas com Giemsa e analisadas em microscópio óptico (200x). O índice de fagocitose (IF) foi calculado, multiplicando-se a porcentagem das células dendríticas que fagocitaram pelo número médio de leveduras por células dendríticas (ODA, *et al.*, 1983).

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

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas em ágar Sabouraud foram coletadas e lavadas três vezes com PBS seguidas de forte agitação em vortex. As células grandes foram sedimentadas espontaneamente e o sobrenadante contendo células pequenas foi recolhido. Para o teste de inibição de fagocitose por manana (Sigma – St. Louis – Estados Unidos), células dendríticas de ambas linhagens de camundongos foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços e incubadas durante 30 minutos com diferentes concentrações de manana (50µg/mL e 100µg/mL). O número de células foi ajustado em Câmara de Neubauer, na proporção de 6 leveduras para cada célula dendrítica. Após este período, acrescentamos à cultura, células leveduriformes pequenas e incubamos durante 4 horas na temperatura de 37°C. As lamínulas foram lavadas com PBS para remover as células de *P. brasiliensis* não fagocitadas e então foram coradas com Giemsa e analisadas em microscópio óptico (200x). O IF foi calculado, multiplicando-se a porcentagem das células dendríticas que fagocitaram pelo número médio de leveduras por células dendríticas (ODA *et al.*, 1983).

Coloração por Giemsa

A técnica de coloração por Giemsa (Newprov – Paraná - Brasil) tem em sua composição corantes ácido e básico, de modo que todas as estruturas celulares possam ser coradas, conforme sua afinidade. Após a coloração, as lamínulas foram fixadas em Entellan® (MERCK – Darmstadt - Alemanha) e posteriormente, analisadas em microscópio óptico (200x).

Imunofenotipagem de células dendríticas através de citometria de fluxo

Após diferenciação das células dendríticas obtidas de medula óssea de camundongos resistentes e susceptíveis, como descrito anteriormente, o fenótipo destas células foi analisado a partir dos seguintes marcadores:

MHC-classe II, CD40, CD54, CD80, CD86, CD11b e seu marcador específico, CD11c, utilizando-se para isso, os anticorpos: anti-camundongo I-A^k (11-5.2) (0,2µg/mL), anti-camundongo CD40 (3/23) (0,2µg/mL), anti-camundongo CD54 (3E2) (0,2µg/mL), anti-camundongo CD80 (16-10A1) (0,2µg/mL), marcados com PE, anti-camundongo CD86 (GL1) (0,5µg/mL), anti-camundongo CD11b (M1/70) (0,5µg/mL) e anti-camundongo CD11c (HL3) (0,5µg/mL), marcados com FITC, todos da Pharmingen. Foram utilizados isotipos controle para cada anticorpo utilizado.

Células dendríticas diferenciadas foram contadas em câmara de Neubauer e aliqotadas (1×10^6 células) em PBS com 0,5% de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab – Campinas, Brasil). Posteriormente, em cada aliqota acrescentamos os anticorpos de marcação (α -MHC-classe II, α -CD40, α -CD80, α -CD86, α -CD11b e α -CD11c) e incubamos no gelo por 30 minutos. Após incubação, acrescentamos solução fixadora (2% de glicose, 1% de formaldeído, diluídos em PBS), deixando-a até análise, onde lavamos as células marcadas com PBS para posteriormente, analisarmos a média de intensidade de fluorescência (MIF) em citometria de fluxo.

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

Interação de células dendríticas com leveduras de *P. brasiliensis* ou gp43

Células dendríticas (5×10^5 células/mL) de camundongos resistentes e susceptíveis diferenciadas e caracterizadas pelo fenótipo descrito anteriormente foram incubadas com leveduras (1×10^6 células/mL) ou com 10 µg de gp43 em placas de 24 orifícios por 24 horas. A ativação ou maturação dessas células foi avaliada pela mudança da expressão dos marcadores: CD54, CD40, MHC-classe II, CD80 e CD86 empregando-se a técnica de citometria de fluxo. O sobrenadante das culturas também foi

coletado e estocado a -70°C para dosagem de citocina por ELISA de captura (IL-12). Como controle negativo foram utilizadas células não estimuladas e como controle positivo as células foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) (Sigma – St. Louis – Estados Unidos).

Indução de resposta imune de linfócitos T 'naive' por células dendríticas

Camundongos foram imunizados subcutaneamente, ao nível do coxim plantar com 50 μL de 3×10^5 células/mL de células dendríticas, previamente diferenciadas e caracterizadas, pelo estímulo por 16 horas com 10 μg de gp43. Após uma semana, os animais foram sacrificados e os linfonodos inguinais e poplíteos retirados. As células foram utilizadas para o ensaio de linfoproliferação e dosagem de citocinas (IL-4, IL-10, IL-2 e IFN- γ).

Ensalo de proliferação celular

Linfonodos de camundongos injetados com células dendríticas foram macerados e as células ajustadas para concentração de 2×10^6 células/mL e plaqueadas a 100 μL por orifício. Em seguida foi acrescentado à cultura o antígeno gp43, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas por 72 horas em estufa de CO_2 , a 37°C e nas últimas 16 horas foi acrescentado 1 μCi de timidina triciada (Amersham Biosciences – Reino Unido) à cultura. Como controle positivo foi utilizado o mitógeno concanavalina A (1 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma – St. Louis – Estados Unidos). Como controle negativo, células dendríticas foram estimuladas com antígeno irrelevante KLH (10 $\mu\text{g/mL}$). Após a incubação, as células foram coletadas em um coletor automático de células (cell harvester), e a radioatividade incorporada foi medida em contador de emissões beta.

Ensalo de dosagem de citocinas

As citocinas IL-4, IL-10, IL-2 e IFN- γ foram dosadas a partir do sobrenadante de cultura de células dos linfonodos após 1 semana de imunização subcutânea no coxim plantar com células dendríticas pulsadas

com gp43 em camundongos resistentes e suscetíveis. IL-12, foi dosada a partir dos sobrenadantes obtidos das culturas de células dendríticas pulsadas ou não com gp43 (10 μ g/mL), ou LPS (100ng/mL). A técnica utilizada nos ensaios foi ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais de captura e detecção contra as citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (RD Systems). Após 36 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -70°C até o uso. As condições adotadas no ensaio foram as seguintes:

- Sensibilização de placas de microtitulação de 96 poços com anticorpo primário diluído em PBS, de um dia para o outro a 4°C;
- Bloqueio de sítios livres do plástico com PBS contendo 1% de BSA, por 1 hora a temperatura ambiente;
- Incubação dos sobrenadantes de cultura e da curva padrão de citocinas recombinantes diluídas em PBS contendo 1% de BSA, por 2 horas a temperatura ambiente. Lavagem dos poços com PBS – Tween 20 a 0,05%;
- Adição dos anticorpos secundário conjugados a biotina, diluídos em PBS e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Lavagem dos poços;
- Incubação com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente. Lavagem dos poços;
- Revelação com o-fenilenodiamina 1mg/mL diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio 0,4M pH 5,3, por 15-30 minutos;
- Bloqueio da reação com H₂SO₄ 4N e leitura das densidades ópticas (DO) em leitor automático, com comprimento de onda de 492nm.

As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

Ensaio de modulação da resposta imune *in vivo*

Preparação do Inóculo

Células fúngicas da cepa Pb18 foram coletadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Posteriormente, o sedimento foi ressuspensão em 10 mL de PBS, deixando-se decantar as partículas maiores. A suspensão mais leve, que contém células isoladas ou com poucos brotamentos, foi coletada com auxílio de seringa de insulina. A contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer.

Infecção Intratraqueal

Os animais foram infectados por injeção intratraqueal (i.t.) com suspensão contendo 1×10^6 células/mL de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ L de PBS. O procedimento foi realizado com os animais sob anestesia seguindo o esquema: 1) administração de 10mL/Kg de peso de solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino) 5,6 dihidro-4H-1,3-tiazina (ROMPUN, Bayer do Brasil – São Paulo) a 0,4% pela via intraperitoneal (i.p.) (0,2mL de ROMPUN); 2) após 10 minutos, administração de 10mL/Kg de peso de hidrato de cloral (Reagen do Brasil) a 2,5% pela via i.p. (0,2mL de hidrato de cloral).

Quando o animal estava insensível à dor (após 10 minutos) foi feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, e a traquéia exposta. A suspensão fúngica foi administrada em um volume total de 50 μ L de PBS. Após a inoculação, a incisão foi suturada e os animais colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia, até acordarem.

Imunizações

Células dendríticas (1×10^5 células em 100 μ L de PBS) depois de diferenciadas e caracterizadas foram incubadas com: 10 μ g de gp43, 100 ng/mL de LPS ou associação da gp43 e LPS por 24 horas. Os camundongos foram imunizados intravenosamente com estas células, 1 semana antes da infecção i.t. com 1×10^6 células/mL de leveduras da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Como controle foram injetadas células sem estímulo antigênico.

Após 4 semanas de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos (pulmões, fígado e baço) foram retirados e macerados para a realização do teste de unidades formadoras de colônia (UFC), avaliando assim, o grau de infecção nos animais imunizados e infectados.

Unidades formadoras de colônias (UFC)

O teste de UFC consiste no crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* em meio sólido, a partir de órgãos macerados, como descrito anteriormente. Após o plaqueamento destes órgãos, contamos as colônias durante 3 semanas, para obtermos a quantidade de colônias por grama de órgão.

O meio de cultura utilizado no plaqueamento se constitui em meio BHI (Bacto-Brain Heart Infusion – OXOID - Inglaterra) suplementado com soro equino (Cultilab – Campinas, Brasil) e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 de *P. brasiliensis*, como fonte de fator de crescimento do fungo a ser isolado, além dos antibióticos penicilina (0,062mg/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Sigma), conforme descrito por Castañeda *et al.*, 1988 e Singer – Vermes *et al.*, 1992.

Análise histopatológica

Para a realização de lâminas histopatológicas dos pulmões, parte do tecido dos animais imunizados e infectados foram retirados e colocados em soluções fixadoras, e posteriormente, foram enviadas ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, para a realização das mesmas, onde foram coradas por hematoxilina e eosina. Secções histológicas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (100x e 200x).

Análise estatística

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

RESULTADOS

RESULTADOS

Caracterização fenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo

Células derivadas da medula óssea de camundongos A/J e B10.A foram cultivadas na presença de GM-CSF recombinante, visando induzir a diferenciação das mesmas em células dendríticas CD11c⁺. Empregando-se a técnica de citometria de fluxo, a população celular obtida foi analisada avaliando-se a expressão dos marcadores CD40, CD80, CD86, MHC-classe II, CD11b, expressos na superfície destas células, bem como, da molécula específica de células dendríticas, CD11c. Como mostra a Figura 1, o perfil da população de células obtidas em cultura, caracteriza fenotipicamente, células dendríticas CD11c⁺, demonstrando ainda a expressão das moléculas CD11b, MHC-II, CD86, CD80 e CD40.

Figura 1 – Caracterização fenotípica de células dendríticas imaturas.

Células obtidas da medula óssea, diferenciadas *in vitro* com GM-CSF recombinante (50ng/mL) foram marcadas com os anticorpos: anti-camundongo I-A^k, anti-camundongo CD80 e anti-camundongo CD40, marcados com o conjugado PE (MHC-II, CD80 e CD40) ou anti-camundongo CD86, anti-camundongo CD11c e anti-camundongo CD11b, marcados com o FITC (CD86, CD11c e CD11b) e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas acima demonstram a expressão dos marcadores de superfície das células diferenciadas em células dendríticas imaturas.

Ensalo de fagocitose

Células dendríticas imaturas derivadas da medula óssea de camundongos resistentes e suscetíveis foram cultivadas com leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 para avaliarmos a capacidade das células dendríticas em fagocitar leveduras deste fungo. As Figuras 2A e 2B, mostram que as leveduras foram fagocitadas por estas células, obtidas de ambas linhagens de camundongos. Podemos observar aumento significativo do índice de fagocitose (IF) de células dendríticas imaturas de animais B10.A, quando comparamos com o IF de células dendríticas obtidas de animais resistentes (Figura 2C).

Para analisarmos se leveduras de Pb18 após terem sido fagocitadas por células dendríticas imaturas, permaneciam viáveis, utilizamos água destilada estéril para lisar as células, liberando assim, o fungo. Desta forma, cultivamos o fungo em meio de cultura semi-sólido, onde seu crescimento foi observado após 2 semanas, como mostrado na Figura 2D

Figura 2 – Fagocitose de *P. brasiliensis* por células dendríticas.

Células dendríticas imaturas de camundongos A/J (Figura 2A) e B10.A (Figura 2B) foram incubadas por 4 horas com leveduras da cepa Pb18, na proporção de 6 leveduras para cada célula dendrítica. Após 4 horas de fagocitose observamos leveduras de *P. brasiliensis* no interior destas células (200x). A Figura 2C mostra o índice de fagocitose (IF) de células dendríticas de camundongos A/J e B10.A e a Figura 2D a viabilidade do fungo após fagocitose. Coloração por Giemsa. * $p < 0,05$ em relação ao IF de células dendríticas de A/J.

Ensalo de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas imaturas obtidas de camundongos A/J e B10.A na presença de manana.

Células dendríticas imaturas de camundongos A/J e B10.A foram incubadas com manana em diferentes concentrações (50µg/mL e 100µg/mL) durante 30 minutos. Após este período, acrescentamos à cultura células fúngicas de *P. brasiliensis* e avaliamos o IF. Observamos diminuição significativa do IF de leveduras por células dendríticas imaturas de ambas linhagens de camundongos, incubadas previamente com 50µg/mL ou 100µg/mL de manana, em relação ao IF de células dendríticas que não foram incubadas com manana (controle), como mostram as Figuras 3A e 3B.

Figuras 3A e 3B – Inibição da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas, na presença de manana.

As Figuras 3A e 3B representam o Índice de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por células dendríticas de camundongos resistentes e suscetíveis, respectivamente, cultivadas com diferentes concentrações de manana. * $p > 0,05$ em relação ao IF de células na ausência de manana (controle).

Expressão de moléculas de superfície de células dendríticas obtidas de camundongos A/J e B10.A imaturas ou ativadas com LPS na presença de *P. brasiliensis*

Para analisarmos o efeito da interação de *P. brasiliensis* com células dendríticas imaturas ou ativadas com LPS, em relação à expressão de marcadores de superfície, essas células foram incubadas com a cepa virulenta Pb18 por 24 horas, sendo a expressão das moléculas de MHC-II, CD40, CD80, CD86 e CD54 analisadas por citometria de fluxo, e a MIF (média de intensidade de fluorescência) determinada.

A análise dos resultados demonstra que células dendríticas imaturas obtidas de camundongos A/J cultivadas na presença de *P. brasiliensis*, diminuíram de maneira significativa os níveis de expressão das moléculas de MHC-II, CD80 e CD54 (Figura 4 e Anexo 1). Entretanto, ao analisarmos células dendríticas obtidas de camundongos B10.A observamos diminuição significativa apenas de MHC-II e CD54 (Figura 5 e Anexo 2). Verificamos também, que células dendríticas obtidas de camundongos A/J, ativadas previamente com 100 ng/mL de LPS e cultivadas na presença de leveduras de *P. brasiliensis*, apresentaram diminuição significativa da expressão das moléculas de MHC-II, co-estimulatórias e de adesão (Figura 4 e Anexo 1). No entanto, células dendríticas ativadas e infectadas de camundongos B10.A, não diminuíram de maneira significativa na expressão da molécula CD86 (Figura 5 e Anexo 2).

Figura 4 – Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas de camundongos A/J ou ativadas com LPS frente ao *P. brasiliensis*.

Células dendríticas imaturas (CD), na presença Pb18 (CD+Pb18), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS), ou ativadas e incubadas com leveduras de Pb18 (CD+LPS+Pb18) foram analisadas quanto a expressão das moléculas de superfície. O gráfico demonstra a média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas (CD) ou ativadas (CD+LPS), frente às leveduras de *P. brasiliensis*. * $p < 0.05$ quando comparados com células dendríticas na ausência de *P. brasiliensis*.

Figura 5 – Fenótipo de células dendríticas imaturas de camundongos B10.A ou ativadas com LPS frente ao *P. brasiliensis*.

Células dendríticas imaturas (CD), na presença de Pb18 (CD+Pb18), células dendríticas ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS), ou ativadas e incubadas com leveduras de Pb18 (CD+LPS+Pb18), foram analisadas quanto a expressão das moléculas de superfície. O gráfico demonstra a média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas (CD) ou ativadas (CD+LPS), frente as leveduras de *P. brasiliensis*. * $p < 0.05$ quando comparados com células dendríticas na ausência de *P. brasiliensis*.

Expressão de moléculas de superfície de células dendríticas de camundongos A/J e B10.A imaturas ou ativadas com LPS na presença de gp43

Ao observar que leveduras da cepa Pb18 têm efeito inibitório na de expressão de moléculas de superfície de células dendríticas obtidas de camundongos das linhagens resistente e suscetível imaturas ou ativadas com LPS, analisamos se o principal componente antigênico do fungo, a gp43, seria o possível causador desta inibição.

Desta forma, células dendríticas imaturas de camundongos A/J e B10.A foram pulsadas com 10 μ g/mL de gp43 por 24 horas, sendo analisadas quanto à expressão de MHC-II, CD54, CD80, CD86 e CD40 empregando-se a técnica de citometria de fluxo. A análise dos resultados mostra que em relação aos níveis basais destas moléculas, observamos diminuição significativa da expressão das moléculas de MHC-II, CD80 e CD54, nas células dendríticas imaturas obtidas de camundongos A/J (Figura 6 e Anexo 3). Entretanto, células dendríticas de camundongos B10.A apresentou diminuição significativa de moléculas MHC-II e CD54 (Figura 7 e Anexo 4).

Avaliando a expressão das moléculas de MHC-II, co-estimulatórias e de adesão de células dendríticas obtidas das linhagens resistente ativadas previamente com 100ng/mL de LPS e pulsadas com 10 μ g/mL de gp43, por 24 horas, observamos inibição significativa da expressão das moléculas de MHC-II, co-estimulatórias e de adesão (Figura 6 e Anexo 3). Entretanto, células dendríticas de camundongos B10.A ativadas e incubadas com gp43, não apresentaram diminuição significativa da expressão da molécula co-estimulatória CD86 (Figura 7 e Anexo 4).

Figura 6 – Efeito inibitório da expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas de camundongos A/J ou ativadas com LPS frente ao antígeno gp43.

Células dendríticas imaturas (CD), pulsadas com gp43 (CD+gp43), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS) ou ativadas e pulsadas com gp43 (CD+LPS+gp43), foram analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície. O gráfico demonstra a média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão das moléculas de superfície de células dendríticas. * $p < 0.05$ quando comparados com células dendríticas na ausência de gp43.

Figura 7 – Efeito inibitório da expressão de moléculas de superfície de células dendríticas imaturas de camundongos B10.A ou ativadas com LPS frente ao gp43.

Células dendríticas imaturas (CD), pulsadas com gp43 (CD+gp43), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS) ou ativadas e pulsadas com gp43 (CD+LPS+gp43), foram analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície. O gráfico demonstra a média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão das moléculas de superfície de células dendríticas. * $p < 0.05$ quando comparados com células dendríticas na ausência de gp43.

Indução de resposta imune de linfócitos T “naive” por células dendríticas estimuladas com gp43

Para analisarmos se células dendríticas pulsadas com gp43 induziria a ativação de linfócitos T “naive” *in vivo*, camundongos resistentes e suscetíveis foram imunizados subcutaneamente no coxim plantar, com células dendríticas estimuladas previamente com o antígeno (gp43). Após 1 semana, os animais foram sacrificados e os linfonodos inguinais e poplíteos foram retirados e macerados, para a realização do ensaio de linfoproliferação e dosagem de citocinas. Desta forma, células obtidas do macerado dos linfonodos foram cultivadas na presença de gp43 ou antígeno irrelevante (KLH) durante 72 horas.

Os resultados encontrados demonstram que células dendríticas pulsadas com gp43, não foram capazes de ativar de forma eficiente linfócitos T “naive” (Figura 8), principalmente células de camundongos B10.A. Além disso, a síntese de citocinas do tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ) não foi a predominante nesses ensaios (Figura 9).

Figura 7– Resposta imune de linfócitos T “naive” de camundongos A/J e B10.A

Linfonodos de animais resistentes e suscetíveis, imunizados previamente com células dendríticas pulsadas com gp43, foram cultivados *in vitro* na presença da gp43 (10µg/mL) ou antígeno irrelevante (10µg/mL).

Figura 8– Produção de citocinas por células totais de linfonodos de camundongos A/J e B10.A

Sobrenadantes de cultura de células de linfonodos de camundongos A/J e B10.A previamente imunizados com células dendríticas pulsadas com gp43, foram coletados e as citocinas IL-2, IFN-γ, IL-4 e IL-10 foram quantificadas por ELISA.

Secreção de IL-12 por células dendríticas obtidas de camundongos A/J e B10.A imaturas ou ativadas com LPS

IL-12 é uma citocina que está envolvida na indução da imunidade mediada por células em patógenos intracelulares, por ativar a produção de IFN- γ por linfócitos T. Além disso, é uma das principais citocinas liberadas por células dendríticas, e são capazes de direcionar a polarização de clones de células Th a secretarem citocinas do padrão Th1, as quais estão envolvidas na resposta imune protetora contra diversos patógenos fúngicos. Diante do exposto, analisamos a síntese de produção desta citocina por células dendríticas imaturas ou ativadas com LPS incubadas com leveduras de *P. brasiliensis* ou pulsadas com o principal componente antigênico do fungo, a gp43.

Células obtidas da medula óssea de camundongos resistentes e suscetíveis, foram diferenciadas *in vitro* pela adição de GM-CSF recombinante em células dendríticas imaturas. Após 7 dias de cultura, estas células foram incubadas com leveduras do fungo ou com 10 μ g/mL de gp43 e/ou com LPS (100ng/mL) por 24 horas. Após este período, o sobrenadante de cultura foi coletado e a IL-12 quantificada pela técnica de ELISA.

A análise dos resultados mostra que os sobrenadantes de cultura de células dendríticas obtidas de camundongos A/J ativadas com LPS e incubadas com leveduras do fungo apresentou diminuição significativa de IL-12 (Figura 10). Analisando a síntese desta interleucina por células dendríticas obtidas de camundongos B10.A observamos inibição da secreção de IL-12 quando estas células estavam imaturas ou quando foram previamente ativadas com LPS e cultivadas com o fungo (Figura 11). No entanto, na presença de gp43 observamos inibição significativa apenas em células incubadas com LPS e não foi observado inibição significativa na produção basal de IL-12 por células dendríticas (Figuras 12 e 13).

Figura 10 – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos A/J imaturas ou ativadas e cultivadas com *P. brasiliensis*

Secreção de IL-12 *in vitro* por células dendríticas imaturas cultivadas com leveduras do fungo (CD+Pb) ou não (CD), ativadas com 100ng/mL de LPS (CD+LPS) ou ativadas e cultivadas com Pb (CD+LPS+Pb). * $p < 0,05$ em relação as células dendríticas imaturas e ativadas com LPS.

Figura 11 – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos B10.A imaturas ou ativadas e cultivadas com *P. brasiliensis*

Secreção de IL-12 *in vitro* por células dendríticas imaturas cultivadas com leveduras do fungo (CD+Pb) ou não (CD), ativadas com 100ng/mL de LPS (CD+LPS) ou ativadas e cultivadas com Pb (CD+LPS+Pb). * $p < 0,05$ em relação às células dendríticas imaturas e ativadas com LPS.

Figura 12 – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos A/J imaturas ou ativadas, na presença de gp43.

Secreção de IL-12 *in vitro* por células dendríticas imaturas pulsadas com 10µg/mL de gp43 (CD+gp43) ou não (CD), ativadas com 100ng/mL de LPS (CD+LPS) ou ativadas e pulsadas com gp43 (CD+LPS+gp43). * $p < 0.05$ em relação às células dendríticas imaturas e ativadas com LPS.

Figura 13 – Produção de IL-12 por células dendríticas de camundongos B10.A imaturas ou ativadas, na presença de gp43.

Secreção de IL-12 *in vitro* por células dendríticas imaturas pulsadas com 10µg/mL de gp43 (CD+gp43) ou não (CD), ativadas com 100ng/mL de LPS (CD+LPS) ou ativadas e pulsadas com gp43 (CD+LPS+gp43). * $p < 0.05$ em relação às células dendríticas imaturas e ativadas com LPS.

Modulação da resposta imune por células dendríticas *in vivo* em camundongos infectados por *P. brasiliensis*

Para avaliar a capacidade de células dendríticas pulsadas com gp43 na modulação da resposta imune na PCM experimental, camundongos A/J e B10.A foram imunizados com CD+gp43 e após 1 semana, foram infectados intratraquealmente com a cepa virulenta do fungo. Os animais foram imunizados endovenosamente com: 1) 1×10^5 células/mL de células dendríticas; 2) 1×10^5 células/mL de células dendríticas imaturas pulsadas com gp43; 3) 1×10^5 células/mL de células dendríticas ativadas com LPS e 4) 1×10^5 células/mL de células dendríticas ativadas com LPS e pulsadas com gp43 $\mu\text{g/mL}$. Após 1 semana, os animais foram infectados intratraquealmente, com 1×10^6 de leveduras de Pb18 e após 4 semanas de infecção os animais foram sacrificados e seus órgãos (pulmão, fígado e baço) retirados, para análise histopatológica e para contagem das unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis*.

Os resultados encontrados demonstram que quando os camundongos A/J foram imunizados 1 semana antes da infecção intratraqueal com 1×10^5 células/mL de células dendríticas ativadas com LPS e pulsadas com gp43, ocorreu aumento significativo da carga fúngica no tecido pulmonar (UFC) destes animais (Figura 14). A análise histopatológica do parênquima pulmonar destes animais revelou a presença de granulomas desorganizados com presença de células gigantes multinucleadas, internalizando células fúngicas de *P. brasiliensis* (Figura 16A). Analisando o tecido pulmonar de animais resistentes que foram previamente imunizados com células dendríticas imaturas e pulsadas com gp43, observamos intenso infiltrado celular inflamatório, presença de lesões granulomatosas desorganizadas e de leveduras isoladas com múltiplos brotamentos, indicando a viabilidade do fungo no tecido (Figura 16B). Entretanto, quando analisamos o parênquima pulmonar dos animais controle, que não foram imunizados, observamos a presença de granulomas organizados, como mostra a Figura 16C.

Imunizando endovenosamente os camundongos B10.A com células dendríticas imaturas pulsadas com gp43, uma semana antes da infecção

intratraqueal com Pb18, observamos aumento significativo da carga fúngica no macerado de pulmão destes animais (Figura 15). Além disso, observamos na análise histopatológica do pulmão destes camundongos, presença de granulomas desorganizados, intenso infiltrado celular e presença de leveduras de *P. brasiliensis* isoladas e em brotamento, como mostra a Figura 16D.

Figura 14 – Unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis* do pulmão de camundongos A/J.

Leveduras de *P. brasiliensis* foram recuperadas dos pulmões de camundongos resistentes, após 4 semanas de infecção. O gráfico demonstra o aumento significativo do número de fungos viáveis no pulmão de camundongos previamente imunizados por via endovenosa, com células dendríticas estimuladas com LPS e pulsadas com 10µg/mL de gp43 (CD+LPS+gp43). * $p < 0,05$ quando comparado com animais que receberam células dendríticas ativadas com LPS, na ausência de gp43 (CD+LPS).

Figura 15 – Unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis* do pulmão de camundongos B10.A.

Leveduras de *P. brasiliensis* foram recuperadas dos pulmões de camundongos suscetíveis, após 4 semanas de infecção. O gráfico demonstra o aumento significativo do número de fungos viáveis no pulmão de camundongos previamente imunizados por via endovenosa, com células dendríticas imaturas pulsadas com 10µg/mL de gp43 (CD+gp43). * $p < 0,05$ quando comparado com animais que receberam células somente suspensão de células dendríticas (CD).

Figura 16 – Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos A/J e B10.A

Figura 16A mostra o parênquima pulmonar de animais resistentes imunizados 1 semana antes da infecção com células dendríticas ativadas e pulsadas com gp43, revelando presença de granuloma desorganizado com células gigantes, multinucleadas internalizando células fúngicas de *P. brasiliensis*; Figura 16B mostra o tecido pulmonar de animais resistentes imunizados com células dendríticas imaturas pulsadas com gp43, revelando presença de granulomas desorganizados e presença de leveduras de *P. brasiliensis* isoladas e em múltiplos brotamentos; Figura 16C mostra o corte histológico de pulmão de camundongos resistentes infectados com a cepa Pb18 (controle), com formação de granuloma compacto; Figura 16D mostra o tecido pulmonar de camundongos B10.A imunizados com células dendríticas pulsadas com gp43, 1 semana antes da infecção com Pb18 apresentando granuloma desorganizado com presença de leveduras de *P. brasiliensis* isoladas e em brotamento (100x e 200x). Coloração por HE.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos mostram que a resistência ou susceptibilidade a algumas doenças causadas por patógenos está relacionada com o padrão de citocinas secretadas pelos linfócitos Th0, polarizando seus clones para o tipo Th1 ou Th2 (CHERWINSKI et al., 1987).

No modelo experimental da PCM, a resistência à infecção em camundongos da linhagem A/J está relacionada com a produção de citocinas que polarizam a resposta celular para o tipo Th1. Em contraste, a secreção de baixos níveis de IFN- γ estão associados com a produção de citocinas do tipo Th2, caracterizando a progressão da doença em animais suscetíveis (B10.A) (CALISH & KASHINO, 1998).

Após entrada do microrganismo no hospedeiro, o antígeno deve ser capturado, processado e apresentado por diferentes células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos).

Células dendríticas são consideradas “profissionais”, pois além de reconhecerem, capturarem e processarem o antígeno, são as únicas entre as APCs, capazes de migrarem até os órgãos linfóides secundários, ativando eficientemente os linfócitos T “naive” (UNANUE & ALLEN, 1987; STEINMAN, 1991; BANCHEREAU et al., 2000; LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2001 e WICK, 2003). Recentes estudos revelam a extraordinária plasticidade de células dendríticas na indução da ativação de células T, a qual deve resultar em formas seletivas de imunidade específica (Th1 ou Th2) (PULENDRAN et al., 1999; MOSER & MURPHY, 2000).

Dependendo do seu estágio de maturação, células dendríticas apresentam fenótipo e funções biológicas diferentes. Células dendríticas imaturas são eficientes na captura de antígenos, internalizando vários microrganismos, através de diferentes receptores (MOLL et al., 1993; GUSMAN et al., 1994; MOLL et al., 1995; FILGUEIRA et al., 1996; HENDERSON et al., 1997; IGIETSEME et al., 1998; OJEIUS et al., 1998; MARRIOTT et al., 1999).

Tendo em vista a importância de células dendríticas na indução da resposta imune e a falta de informações a respeito da interação dessas células com o fungo *P. brasiliensis*, o principal objetivo do trabalho foi analisar os mecanismos e possíveis efeitos da relação das células dendríticas com o fungo.

Primeiramente, estudamos a capacidade de células dendríticas imaturas obtidas de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) em fagocitar o fungo. Posteriormente, pesquisamos a possível via utilizada na internalização deste patógeno.

Os resultados mostraram que células dendríticas imaturas, de ambas linhagens de camundongos, fagocitaram eficientemente leveduras de *P. brasiliensis*, entretanto, o índice de fagocitose de células obtidas de animais suscetíveis foi significativamente maior quando comparado com células de camundongos resistentes. Esse resultado mostrou que células dendríticas de camundongos suscetíveis internalizaram um número maior de leveduras quando comparado com células de camundongos resistente, sugerindo que essas células perderiam facilitar a entrada do patógeno. Esse processo poderia ser considerado um mecanismo de escape do fungo, por estar teoricamente mais protegido do sistema imunológico no interior dessas células.

Para analisar essa hipótese, a viabilidade dos fungos foi testada após 4 horas de fagocitose. Os resultados mostraram que, células dendríticas de camundongos A/J e B10.A não foram capazes de eliminar o patógeno após a fagocitose. Observamos também, que o número de leveduras viáveis foi maior em células de camundongos suscetíveis, mostrando que o maior índice de fagocitose observado anteriormente refletiu em um maior número de colônias viáveis, ou seja, células desses animais fagocitaram mais, porém não conseguiram eliminar os fungos.

Dados da literatura relatam que células dendríticas expressam lectina tipo C, incluindo receptores para manose (CD206) e DC-SIGN (CD209), as quais se ligam a estruturas de carboidrato de microrganismos e estão envolvidos em suas internalizações (FIGDOR et al., 2002). Desse modo,

analisamos se os receptores de manose, presentes nas células dendríticas seria a principal via de fagocitose das células fúngicas de *P. brasiliensis*.

Nossos resultados revelaram inibição do índice de fagocitose de leveduras por células dendríticas, quando adicionamos manana a cultura, demonstrando que receptores de manose devem ser a principal via de entrada de *P. brasiliensis* nestas células. Estes resultados são consistentes com os encontrados por ALMEIDA et al., em 1998, pois estes autores, demonstraram que na superfície de *P. brasiliensis* existem complexos moleculares contendo proteínas e polissacarídeos com altas proporções de manose. Além disso, estes autores demonstraram que fagocitose de leveduras deste fungo por macrófagos peritoneais murino *in vitro*, foi inibida quando D-manose e D-fucose foram adicionadas à cultura, indicando que endocitose do fungo por macrófagos peritoneais seja mediado por receptores de manose.

Ainda, como descrito por vários autores, receptores de manose são responsáveis pela fagocitose de conídeos de *Aspergillus fumigatus* (BOZZA et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (SYME et al., 2002) e de leveduras de *Candida albicans* por células dendríticas mielóides imaturas (ROMANI et al., 2002). Além disso, a entrada de leveduras através destes receptores resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, aumento de moléculas co-estimulatórias e de MHC, ativando células dendríticas e fazendo com que estas células se tornem eficientes na apresentação de antígenos (ROMANI et al., 2002).

Analisando nossos resultados e os dados da literatura, acreditamos que os fungos estão sendo internalizados via receptores de manose. A entrada do fungo através desta via deve ser favorecida pelo *P. brasiliensis* apresentar em sua constituição este carboidrato, visto que, células dendríticas capturam antígenos que possuem manose em sua constituição, demonstrando uma eficácia de 100 a 1000 vezes maior em relação aos antígenos que não apresentam este carboidrato (ENGERING et al., 1997). Contudo, este resultado, não justifica o aumento de leveduras fagocitadas por células dendríticas imaturas de camundongos suscetíveis, visto que a

inibição desta via foi similar nas células dendríticas obtidas de ambas linhagens de camundongos. Talvez, pela suscetibilidade do animal, a internalização de leveduras de *P. brasiliensis* tenha sido facilitada, mas o mecanismo pelo qual esse fator ocorre ainda é desconhecido, podendo ser um dos motivos pelo qual estes animais não consigam conter a infecção após fagocitose do fungo.

Após o reconhecimento e internalização de estruturas microbianas, as células dendríticas começam a maturar, aumentando a expressão de moléculas MHC-II, co-estimulatórias e de adesão. Este processo é acompanhado pela migração destas células dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides secundários (MOLL et al., 1993).

Devido à importância do aumento da expressão das moléculas de superfície das células dendríticas após reconhecimento e captura do antígeno, analisamos os efeitos que o *P. brasiliensis* ou a gp43 poderiam estar causando na expressão destas moléculas.

Os resultados obtidos demonstram inibição da expressão de moléculas de MHC-II, CD40, CD54, CD80 e CD86, na superfície de células dendríticas imaturas obtidas de camundongos resistentes e suscetíveis. No entanto, esses efeitos inibitórios poderiam estar sendo causados pelo principal componente antigênico do fungo, a gp43, visto que, os resultados encontrados quando incubamos estas células com esta glicoproteína foram similares aos observados anteriormente.

Como as leveduras de *P. brasiliensis*, bem como a gp43 não foram capazes de ativar células dendríticas obtidas de ambas linhagens de camundongos, utilizamos um estímulo bem conhecido para induzir ativação/maturação destas células, o LPS (RESCIGNO et al., 1999). Os principais efeitos deste estimulador são no fenótipo de células dendríticas imaturas, causando aumento das moléculas B.7, CD40, CD54 e MHC-II (VERHASSELT et al., 1997; RESCIGNO et al., 1998). Entretanto, células dendríticas de camundongos A/J e B10.A previamente incubadas com LPS, não foram ativadas quando cultivadas com leveduras do fungo ou com a

gp43, permanecendo com alterações fenotípicas, ou seja, inibição da expressão das moléculas descritas anteriormente.

Os resultados encontrados anteriormente podem estar relacionados com a família de receptores “Toll Like”, que está presente em células dendríticas imaturas (KAISHO & AKIRA, 2001). O LPS liga-se a receptores de Toll 4, estimulando assim, componentes citoplasmáticos da via de sinalização do NF- κ B, modulando a maturação de células dendríticas. Portanto, alguns componentes do fungo *P. brasiliensis*, bem como a gp43, podem estar se ligando ao mesmo receptor, impedindo a ativação de células dendríticas, como um mecanismo de evasão da resposta imunológica, já que estudos recentes indicam que TLR4 estão envolvidos na regulação e ativação da imunidade adaptativa, as quais levam a uma resposta antígeno-específica contra patógenos (SCHNARE et al., 2001).

Consistente com nossos resultados, OVERTVELT em 1999, demonstrou que na patologia causada por *Trypanosoma cruzi*, o processo de maturação de células dendríticas induzidas por LPS foi drasticamente afetada, apresentando diminuição da expressão de HLA-DR e CD40, moléculas importantes na apresentação de antígeno e no co-estímulo aos linfócitos T “naive”; já em 2002, OVERTVELT et al verificaram que o mesmo parasita foi capaz de inibir moléculas de MHC e coestimulatórias em modelo murino, impedindo ativação eficiente das células dendríticas.

BRODSKYN et al., em 2002, mostraram que a molécula GIPL (glicoinositolfosfolípide) de *T. cruzi* interfere com as funções biológicas de macrófagos e células dendríticas, através da inibição da expressão das moléculas de superfície destas células. Estes autores observaram que estimulando previamente células dendríticas humanas com LPS e GIPL ocorreu diminuição da expressão das moléculas HLA-DR, CD40, CD80, CD83 e CD86, além da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL12 e TNF- α , contribuindo para que o parasita escape da imunidade inata e permita o estabelecimento da infecção.

Plasmodium falciparum, como relatado por URBAN e ROBERTS em 2002, inibem a maturação das células dendríticas e as funções

estimulatórias das células T através da aderência de eritrócitos infectados a estas células, diminuindo assim, a expressão de HLA-DR.

Outra estratégia de escape conveniente de alguns patógenos, pode ser a inibição do processo de migração das células dendríticas. Componentes de *Leishmania* inibem células dendríticas esplênicas em transportarem o antígeno até os órgãos linfóides secundários (JEBBARI, et al 2002), impedindo a formação de uma resposta imune protetora eficiente.

Entretanto, a indução da imunidade protetora por células dendríticas pulsadas com antígenos microbianos foi relatado em diversas infecções, incluindo aquelas causadas por *Candida albicans* (FE d'Ostiani et al., 2000), *Clamidia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, diversos vírus (revisado por MOLL e BERBERICH, 2001), *Salmonella* ssp (SVENSSON et al., 1997; MARRIOTT et al., 1999), *Escherichia coli* (SVENSSON et al., 1997), *Listeria monocytogenes* (GUZMAN et al., 1996), *Bordetella bronchiseptica* (GUZMAN et al., 1994) e *L. major*. Como demonstrado por Moll e colaboradores (1993), células dendríticas nesta parasitose, medeiam ativação de células T antígeno-específicas e produzem altos níveis de IL-12 após contato com o parasita (GORAK et al., 1998; von STEBUT et al., 1998), promovendo assim, o desenvolvimento de células Th1 protetoras. Estes encontros confirmam as potentes funções imunomodulatórias das células dendríticas e demonstram que estas células podem servir em modelos de imunoterapia e vacinação.

A ativação de células dendríticas por antígenos microbianos induz a produção de citocinas como a IL-12, IL-18 ou IL-10, as quais devem promover o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 ou Th2 (REIS & SOUSA 1997; MOSER & MURPHY, 2000).

Analizamos a produção de IL-12 por células dendríticas obtidas de camundongos das linhagens A/J e B10.A, cultivadas na presença do fungo ou de gp43, pois como descrito, a produção desta citocina é importante na ativação de uma resposta protetora do tipo Th1. Os resultados revelaram inibição da síntese basal desta interleucina por células dendríticas obtidas de camundongos suscetíveis na presença de leveduras de *P. brasiliensis* o

mesmo resultado foi observado quando essas células foram ativadas com LPS. Porém, quando células de camundongos resistentes foram analisadas observamos inibição apenas em células ativas com LPS, não observando diferença da produção basal da IL-12. Esse resultado poderia refletir o maior número de leveduras internalizadas por células dendríticas imaturas de camundongos suscetíveis em relação a camundongos resistentes, que estariam de alguma forma afetando funções intracelulares relacionadas com a produção basal de IL-12.

Quando gp43 foi avaliada nesse sistema, observamos que essa molécula afeta apenas células dendríticas ativadas previamente com LPS em ambas linhagens testadas. Mostrando que a via de ativação dessas células poderia ser inibida na presença de gp43.

Essas inibições causadas durante a cinética de ativação de células dendríticas, podem comprometer algumas funções biológicas destas células, tais como o reconhecimento de patógenos, adesão, migração, apresentação de antígenos (FENTON & GOLENBECK, 1998) e conseqüentemente, a amplificação da resposta de células T, pois como descrito, as moléculas co-estimulatórias participam da ativação eficiente destas células (LINSLEY et al., 1991; FREEMAN et al., 1993).

Visto que a gp43 estava modulando as funções das células dendríticas de ambas linhagens de camundongos, através da inibição das moléculas de MHC-II, co-estimulatórias e de adesão, bem como a produção da principal citocina secretada por estas células, nós analisamos a resposta imune de linfócitos T “naive” em camundongos resistentes e suscetíveis, que foram previamente imunizados com células dendríticas pulsadas com gp43.

Os resultados obtidos revelaram que células dendríticas pulsadas com gp43 não foram capazes de estimular eficientemente linfócitos T “naive”, pois células obtidas dos linfonodos destes animais, quando cultivadas *in vitro* na presença da glicoproteína, apresentaram baixa resposta proliferativa. No entanto, induziram a secreção de citocinas, como IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-2, caracterizando um padrão misto de resposta imunológica (Th1/Th2).

Na PCM, camundongos A/Sn (resistentes) e B10.A (suscetíveis) que tiveram o IFN- γ neutralizado apresentaram exacerbação da infecção pulmonar e disseminação para os órgãos extrapulmonares, e tiveram sua resposta imune celular comprometida (CANO et al., 1998). Foi constatado que esta mesma citocina é pouco secretada em pacientes com PCM ativa (KARHAWI et al., 2000). Portanto, torna-se evidente que a resposta imune protetora na PCM deva ser sustentada por linfócitos do tipo 1, ou por outra fonte secretora de IFN- γ .

KASHINO, et al em 1997, trabalhando com camundongos isogênicos resistentes e suscetíveis ao *P. brasiliensis*, verificaram que células de linfonodos de animais resistentes, produziam IFN-gama e IL-2, enquanto em animais suscetíveis, havia baixa produção de IFN-gama. Os resultados obtidos indicam a produção preferencial de citocinas do tipo 1 em camundongos resistentes, enquanto que, em camundongos suscetíveis, houve ativação preferencial de células produtoras de citocinas do tipo 2, como a IL-10.

De acordo com os dados acima, acreditamos que o fungo e seu principal antígeno estejam modulando a resposta imune para o tipo Th2, não protetora na PCM.

Durante o desenvolvimento do trabalho, observamos *in vitro*, alterações fenotípicas e biológicas importantes nas células dendríticas, quando estas foram cultivadas na presença do fungo e da gp43, então, avaliamos a modulação da resposta imune por células dendríticas *in vivo*.

Os camundongos das linhagens resistentes e suscetíveis foram imunizados com células dendríticas pulsadas ou não com a gp43 e posteriormente, os animais foram infectados intratraquealmente com leveduras da cepa altamente virulenta do fungo (Pb18).

Ocorreu aumento da carga fúngica no tecido pulmonar de camundongos resistentes, previamente imunizados endovenosamente com células dendríticas ativadas e pulsadas com gp43. A análise histopatológica do parênquima pulmonar destes animais, revelou presença de granulomas desorganizados com numerosas células fúngicas, resultados estes

compatíveis com o aumento da carga fúngica no tecido. Apesar de observamos uma diminuição da carga fúngica quando os animais foram imunizados com células dendríticas imaturas pulsados com gp43 esses resultados não foram significante. Uma possível hipótese para esses resultados seria que a imunização com células dendríticas pulsados com gp43, principalmente ativada com LPS, poderia estar, *in vivo*, induzindo uma resposta específica do tipo Th2, que facilitaria a instalação desse patógeno no tecido pulmonar. A presença de resposta do tipo Th2 poderia ser induzida pela baixa expressão de moléculas co-estimulatória e baixa produção de IL-12 observado *in vitro*.

Em camundongos suscetíveis, no entanto, revelou aumento da carga fúngica no pulmão apenas de animais imunizados com suspensão de células dendríticas imaturas pulsadas com gp43. O aumento de carga fúngica nesses animais não ficou tão evidente como os observados em camundongos resistentes. A carga fúngica nesses animais já é elevada mesmo em camundongos controles, sendo assim difícil observar aumento significativo com a imunização de células dendríticas pulsadas com gp43. Outro fato importante é que esses animais, ao contrário de camundongos resistentes, já desenvolvem resposta do tipo Th2 durante a evolução da doença.

Em estudos realizados por POPI et al, em 2002, verificaram que macrófagos peritoneais obtidos de camundongos resistentes (A/Sn) e suscetíveis (B10.A) quando cultivados com leveduras de *P. brasiliensis* foram capazes de eliminar as células fúngicas. Entretanto, quando estes autores adicionaram gp43 a cultura, observaram diminuição da capacidade dos macrófagos obtidos de ambas linhagens de camundongos em eliminarem as leveduras deste fungo, acarretando no aumento das unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis*.

Estudos realizados por POPI et al (2002) e por nosso laboratório demonstram que a gp43 inibe as principais funções biológicas de macrófagos e de células dendríticas, respectivamente. Além disso, a gp43 liga-se a laminina, aumentando adesão e conseqüentemente, a invasão

tecidual (VICENTINI et al., 1994) e está presente no soro e nos fluidos cerebrospinal e broncoalveolar de pacientes com as formas aguda e crônica da PCM (SILVA et al., 2003). Estes dados são importantes para entendermos o possível mecanismo de evasão do fungo, já que atualmente acredita-se que componentes dos fungos não são participantes passivos nos processos infecciosos, mas estão sendo considerados fatores de virulência importantes dentro das patologias (CUTLER, 1991; HOGAN, 1996; CALDERONI & FONZI, 2001).

P. brasiliensis, assim como outros agentes infecciosos, desenvolvem múltiplos mecanismos para se evadir do sistema imune do hospedeiro. Como as células dendríticas são importantes na conexão do sistema imune inato e adaptativo, a inibição da maturação, migração e apresentação de antígeno, bem como, a ineficiente ativação de células T mediadas por células dendríticas, provém meios que facilitam a sobrevivência do patógeno no hospedeiro.

De acordo com nossos resultados e os descritos na literatura, acreditamos que a gp43 seja um fator de virulência importante na PCM. O principal componente antigênico do fungo, a glicoproteína de 43 kDa pode estar sendo usada como principal mecanismo de escape do fungo para se evadir do sistema imune facilitando o estabelecimento da infecção primária no hospedeiro suscetível.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho foram:

- Células dendríticas obtidas de camundongos das linhagens A/J e B10.A fagocitam eficientemente leveduras de *P. brasiliensis*. No entanto, células dendríticas de animais suscetíveis facilitam a internalização deste patógeno, por mecanismos desconhecidos, mas que favorecem a sobrevivência do fungo no interior destas células;
- Leveduras de *P. brasiliensis*, bem como seu principal componente antigênico, a gp43 afetam as principais funções biológicas das células dendríticas provenientes de camundongos A/J e B10.A, inibindo a expressão das moléculas de MHC-II, co-estimulatórias e de adesão;
- A síntese de IL-12, a principal citocina secretada por células dendríticas foi inibida quando estas células, obtidas de ambas linhagens de camundongos foram cultivadas com o fungo ou quando foram pulsadas *in vitro* com gp43;
- Células dendríticas pulsadas com gp43 não são capazes de ativar eficientemente os linfócitos T “naive”, induzindo um padrão misto (Th1/Th2) de resposta, com a síntese de IL-2, IL-10, IFN- γ e IL-4;
- A modulação da resposta imune *in vivo*, por células dendríticas de camundongos infectados intratraquealmente com leveduras da cepa virulenta Pb18, revelou uma resposta imune não protetora, com aumento das unidades formadoras de colônias em animais imunizados com células dendríticas pulsadas com gp43;
- Em conclusão, a gp43 de *P. brasiliensis* pode estar sendo usada com um mecanismo de evasão do fungo, visto que esta glicoproteína inibe as

principais funções de células dendríticas, favorecendo assim, uma resposta imune não protetora, que facilita sua permanência no hospedeiro, tornando-o suscetível a PCM.

ANEXOS

ANEXO 1

A/J

Figura 1: Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas de camundongos A/J ou ativadas com LPS, frente ao *P. brasiliensis*.

Células dendríticas imaturas (CD), na presença Pb18 (CD+Pb18), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS), ou ativadas e incubadas com leveduras de Pb18 (CD+LPS+Pb18) foram analisadas quanto a expressão das moléculas de superfície. O histograma demonstra a expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas (CD) ou ativadas (CD+LPS), frente às leveduras de *P. brasiliensis*. A primeira coluna representa o isotipo controle de cada anticorpo utilizado.

ANEXO 2

B10.A

Figura 2: Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas de camundongos B10.A ou ativadas com LPS, frente ao *P. brasiliensis*.

Células dendríticas imaturas (CD), na presença Pb18 (CD+Pb18), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS), ou ativadas e incubadas com leveduras de Pb18 (CD+LPS+Pb18) foram analisadas quanto a expressão das moléculas de superfície. O histograma demonstra a expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas (CD) ou ativadas (CD+LPS), frente às leveduras de *P. brasiliensis*. A primeira coluna representa o isotipo controle de cada anticorpo utilizado.

ANEXO 3

A/J

Figura 3: Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas de camundongos A/J ou ativadas com LPS, frente à gp43.

Células dendríticas imaturas (CD), pulsadas com gp43 (CD+gp43), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS), ou ativadas e inculsadas com gp43 (CD+LPS+gp43) foram analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície. O histograma demonstra a expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas (CD) ou ativadas (CD+LPS), frente à gp43. A primeira coluna representa o isotipo controle de cada anticorpo utilizado.

ANEXO 4

B10.A

Figura 4: Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas de camundongos B10.A ou ativadas com LPS, frente à gp43.

Células dendríticas imaturas (CD), pulsadas com gp43 (CD+gp43), ativadas com LPS (100ng/mL) (CD+LPS), ou ativadas e inculsadas com gp43 (CD+LPS+gp43) foram analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície. O histograma demonstra a expressão das moléculas de superfície de células dendríticas imaturas (CD) ou ativadas (CD+LPS), frente à gp43. A primeira coluna representa o isotipo controle de cada anticorpo utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **J. Immunol.**, 163: 3890-3897, 1999.

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

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

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

ALMEIDA S. R., UNTERKIRCHER C. S., CAMARGO Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Med. Mycol.** 36:405-411, 1998.

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

ANSORGE, W. Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. **Electrophoresis**. 82:235-42, 1983.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BOZZA, S., R. GAZIANO, A. SPRECA, A. BACCI, C. MONTAGNOLI, P. di FRANCESCO, AND L. ROMANI. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. **J. Immunol.** 168:1362-1371, 2002.

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

BRODSKYN, C., PATRICIO, J., OLIVEIRA, R., LOBO, L., ARNHOLDT, A., MENDONÇA-PREVIATO, L., BARRAL, A., AND BARRAL-NETTO, M. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infection and Immunity.** 3736-3743, 2002.

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

CALDERONE, R. A. AND FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.** 9:327-334, 2001.

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGUEIR, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, 66:585-594, 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, ES, 1988. **Proceedings. Ed. J.M. Torres-Rodrigues, J.R. Prous Science, Barcellona**, p.154-9 1988.

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

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

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

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

CANO, L. E., KASHINO, S. S., ARRUDA, C., ANDRÉ, D., XIDIEH, C. F., SINGER-VERMES, L. M., VAZ, C. A. C., BURGER, E., AND CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** 66(2):800-06, 1998.

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. **J. Med. Vet. Micol.** 26:351-58, 1988.

CHERWINSKI, H. M., SCHUMACHER, J. H., BROWN, K. D., AND MOSMANN, T. R. Two types of mouse helper T cell clone. III Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J. Exp. Med.** 166(5):1229-44, 1987.

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

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

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

CUTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu. Ver. Microbiol.** 45:187-218, 1991.

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

DEL NEGRO, G., LACAZ, C.S., ZAMITH, V.A., SIQUEIRA, A.M. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood, in: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. (Eds), Paracoccidioidomycosis, **CRC Press, Boca Raton**, pp.225-232, 1994.

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

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. **J. Immunol.** 155:1725-36, 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. **J. Immunol.** 157:541-48, 1996.

FÈ d'OSTIANI, C., DEL SERO, G., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., SPRECA, A., MENCACCI, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., AND ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. **J. Exp. Med.** 15:1661, 2000.

FENTON, M. J., GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **J. Leukoc. Biol.** 64(1):25-32, 1998.

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

FERREIRA, M.S., FREITAS, L.H., LACAZ, C.S., DEL NEGRO, G.M., MELO, N.T., GARCIA, N.M., ASSIS, C.M., SALEBIAN, A., HEINS-VACCARI, E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a

dog food probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.** 28:253-256, 1990.

FIGDOR, C. G., van KOOYK, Y., AND ADERMA, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. **Nat. Rev. Immunol.** 2: 77-84, 2002.

FILGUEIRA, L., F. O. NESTLE, M. RITTING, H. I. JOLLER, AND P. GROSCURTH. Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. **J. Immunol.** 157:2998-3005, 1996.

FLOHÉ, S.B., BAUER, C., FLOHÉ, S., AND MOLL, H. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.** 28:3800-3811, 1998.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 25: 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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 20: 129-132, 1987.

FREEMAN, G. J., F. BORRIELLO, R. J. HODES, H. RESIER, J. G. GRIBBEN, J. W. NG, J. KIM, J. M. GOLDBERG, K. HATHCOCK, G. LASZLO, L. A. LOMBARD, S. WANG, G. S. GRAY, L. M. NADLER, AND A. H. SHARPPE. Murine B7-2, na alternative CTLA-4 counter-receptor that costimulates T-cell proliferation and inteleukin 2 production. **J. Exp. Med.** 178:2185-2192, 1993.

FUNGIER-VIVIER, I.; SERVET-DELPRAT, C.; RIVAILLER, P.; RISSOAN, M.C.; LIU, Y.J. AND RABOURDIN-COMBE, C. Measles virus suppresses

cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. **J. Exp. Med.** 186:813-823, 1997.

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

GEISSMANN, F., LAUNAY, P., PASQUIER, B., LEPELLETIER, Y., LEBORGNE, M., LEHUEN, A., BROUSSE, N., MONTEIRO, R.C. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon crosslinking by IgA complexes. **J. Immunol.** 166:346-52, 2001.

GESZTESI, J. L.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; VICENTINI, A.P.; MORAES, J.Z.; FRANCO, M.F. & LOPES, J.D. Monoclonal antibodies against the 43.000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hibridoma**, 16: 415-418, 1996.

GEZUELE E.. Aislamiento de *Paracoccidioides sp* de heces de pinguino de la Antártida. Anais do IV Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Caracas, Venezuela. **Resumo nº B2**, 1989.

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

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

GORAK, P. M., C. R. ENGWERDA, AND P. M. KAYE. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol.** 28:687, 1998.

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

GUZMAN, C., M. ROHDE, M. BOCK, AND K. N. TIMMIS. Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. **Infect. Immun.** 62:5528-5537, 1994.

GUZMAN, C. A., E. DOMANN, M. ROHDE, D. BRUDER, A. DARJII, S. WEISS, J. WEHLAND, T. CHARRABORTY, AND K. N. TIMMIS. Apoptosis of mouse dendritic cells triggered by listeriolysin, the major virulent determinant of *Listeria monocytogene*. **Mol. Microbiol.** 20:119-126, 1996.

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

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

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

HENDERSON, R. A., S. C. WATKINS, AND J. L. FLYNN. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** 159:635-643, 1997.

HOGAN, L. H. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Ver.** 9:469-488, 1996.

IGIETSEME, J. U., L. I. PERRY, A. G. ANNABA, I. M. URIRI, ° ° OJIOR, S. N. KUMAR, AND H. D. CALDWELD. Chlamydial infection in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Infect. Immun.** 66:1282-1286, 1998.

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. **J. Exp. Med.**, 176: 1693-1697, 1992.

JEBBARI, H., STAGG, A. J., DAVIDSON, R. N., AND KNIGHT, S. C. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility *in vitro*. **Infect. Immun.** 70:1023-1026, 2002.

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

KARHAWI, A. S. K., COLOMBO, A. L. AND SALOMÃO, R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.** 38:225-9, 2000.

KALINSKI P., HILKENS C.M., WIERENGA E.A., KAPSENBERG M.L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol. Today** 20 (12): 561-7, 1999.

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

KASHINO, S. S. Produção de citocinas por camundongos resistentes e suscetíveis à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. **Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.**

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

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

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

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. **CRC Press Boca Raton, da USA**. pp. 1-11, 1994.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227 (259):680-5, 1970.

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

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

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

LINSLEY, P. S., W. BRADY, L. GROSMIRE, A. ARUFFO, N. K. DAMLE, AND J. A. LEDBETTER. Binding of B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T-cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173:721-730, 1991.

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

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

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

LOTZE, M.T. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Ann. Surg.*, 226: 6-9, 1997.

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

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

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

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

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

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

MARRIOTT, L. T. G. HAMMOND, E. K. THOMAS, AND K. L. BOST. Salmonella efficiently enter and survive within cultured CD11c+ dendritic cells initiating cytokines. **Eur. J. Immunol.** 29:1107-1115, 1999.

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

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

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

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

MOLL, H., FLOHE, AND M. ROLLINGHOFF. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. **Eur. J. Immunol.** 25:693-699, 1995.

MOLL, H., BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. **Immunobiology.** 204 (5): 659-66, 2001.

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

MOSER, M., AND K. M. MURPHY. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. **Nat. Immunol.** 1:199, 2000.

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

NEGRONI, P. Estudios sobre la ecología Del *Paracoccidioides brasiliensis* em la Argentina. **El. Tórax XVII**; 60-62, 1968.

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

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

OJEIUS, D. M., Y. BRAVO DE ALBA, J. M. KANELLOPOULOS, R. A. KELLY, R. G. RANK, AND A. DAUNTRY-VARSAT. Internalization of Chlamydia by dendritic cells and stimulation of chlamydia-specific T cells. **J. Immunol.** 160:1297-1303, 1998.

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

OVERTVELT, L. V., ANDRIEU, M., VERHASSELT, V., CONNAN, F., CHOPPIN, J., VERCRUYSE, V. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8+ T lymphocytes. **Int. Immunol.** 14:1135-1144, 2002.

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

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

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

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

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

PUCCIA, R., TAKAOKA, D. T., TRAVASSOS, L. R. Purification of the 43kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (Tom medium). **J. Med. Vet. Mycol.** 29(1):57-60, 1991.

PULENDRAN, B., J.L. SMITH, G. CASPARY, K. BRASEL, D. PETTIT, E. MARASKOVSKY, AND C. R. MALISZEWSKI. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96: 1036, 1999.

REIS E SOUSA, C., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., JANKOVIC, D., CHARSET, H., GERMAIN, R.. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin IL-12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J. Exp. Med.** 186:1819-1829, 1997.

RESCIGNO, M., MARTINO, M., SUTHERLAND, C. L., GOLD, M. R., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. **J. Exp. Med.** 188:2175-2180, 1998.

RESCIGNO, M., GRANUCCI, F., CITTERIO, S., FOTI, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. **Immunol. Today** 20(5):200-3, 1999.

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

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

RESTREPO, A. & MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Appl. Microbiol.**, 28: 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. **Infect. Immun.** 46:346-345, 1984.

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

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

RESTREPO, A., McEWEN, J. G., CASTANEDA, E. *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.** 39(3):233-41, 2001.

ROMANI, L., BISTONI, F. AND PUCETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **TRENDS in Microbiology**. 10:508-514, 2002.

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

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

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

SCHNARE, M., BARTON, G. M., HOLT, A. C., TAKEDA, K., AKIRA, S., AND MEDZHITOV, R. Toll like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat. Immunol.** 2:947-950, 2001.

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

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

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

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

SILVIA, H. M. S., ARNALDO, L. C., MARIA, H. S. L. B., JOSÉ, D. L., FLÁVIO, Q. T., ZOILO, P. C. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microb.** 41:3675-3680, 2003.

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

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

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

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

SINGER-VERMES, L.M.; CIAVAGLIA, M.C.; KASHINO, S.S.; BURGER, E.; CALICH, V.L. The source of the growth-promoting factor (s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.** 30(3):261-4, 1992.

STEBUT, E. Y., BELKAID, T. JAKOB, D. L. SACKS, AND M. C. UDEY. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin IL-12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **J. Exp. Med.** 188:1547, 1998.

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

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

STEINMAN, R.M. Dendritic cells and immune-based therapies. **Exp. Hematol.**, 24: 859-863, 1996.

STEINMAN, R.M., POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **The Journal of Clinical Investigation.** 109:1519-1526, 2002.

SVENSSON, M., B. STOCKINGER, AND M. J. WICK. Bone-marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. **J. Immunol.** 158:4229-4236, 1997.

SYME, M. R., SPURREL, L. C., AMANKWAH, K. E., GREEN, Y. H. F, AND MODY, H. C. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc γ receptor II for presentation to T lymphocytes. **Infection and Immunity.** 70:5972-5981, 2002.

TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M. & TRAVASSOS, L.R. Mapping of the T-cell epitopes in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th1 responses protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, 66: 786-790, 1998.

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

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

URBAN, B. C., AND ROBERTS, D. J. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infect erythrocytes switches off host cells. **Curr. Opin. Immunol.** 14:458-465, 2002.

VERHASSELT, V., BUELENS, C., WILLEMS, F., DE GROOTE, D., HAEFFNER-CAVAILLON, N., GOLDMAN, M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J. Immunol.** 158:2919-2925, 1997.

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

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

WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; BREITTMAYER, J.; COTTREZ, F.; AND GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, 18:605-617, 2003.

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

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

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**. 15: 79-85, 1977.

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