

HEIDE BAIDA

**Importância das células dendríticas na resposta
imune celular de pacientes com
paracoccidioidomicose**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

São Paulo

2007

Dedicatória

Ao meu pai Teófilo (in memoriam), que dedicou a mim durante toda sua vida seu verdadeiro amor, eu dedico esta minha conquista, pois sem você nada disso teria sido possível. Amo você pra sempre.

A minha mãe Santinha, pois você merece todo meu grande amor, gratidão e admiração. Você é guerreira e vencedora desde sempre. Você é simplesmente demais!

A você Walmir pelo apoio, paciência, confiança e principalmente por ter transformado minha vida em pura felicidade. Amo você.

“A mim mesmo pareço ser um menino que brinca à beira da praia, ora achando uma pedra mais polida ou uma concha mais formosa, enquanto o grande oceano da verdade se estende, ignoto, diante de mim.”

ISAAC NEWTON

Agradecimentos

Aos pacientes, que mesmo diante da aflição e incerteza de sua condição física, sentem-se orgulhosos em colaborar para o avanço nos estudos da Paracoccidiodomicose.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pelo apoio e oportunidade concedidos, para que fosse possível a realização deste projeto, mas principalmente de um sonho.

A Dra. Carla Cristina Romano, por ter partilhado comigo todo seu conhecimento, competência e principalmente sua amizade. A minha gratidão será para sempre.

Ao Prof. Dr. Gil Benard, que colaborou de forma fundamental na captação dos pacientes e também por partilhar de todo seu conhecimento científico.

A Profa. Dra. Maria Notomi Sato, que participou desde o início revisando de forma tão dedicada todo o projeto. E ainda hoje, por seu apoio e confiança depositados.

A Dra. Telma Miyuki Oshiro pela atenção e cuidado na correção do texto final.

A Soraya Ogusuku, por seu companheirismo, dedicação e esforço.

A Noemia Mie Orii e Rosangela Maria Araújo, por todo ensinamento que foi fundamental do começo ao fim.

A todos os pesquisadores e alunos do LIM-56, que em algum momento participaram da construção deste trabalho.

A todos os funcionários do LIM-56, que em todos esses anos construímos uma forte amizade. Muito obrigada por tudo.

A Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini que gentilmente forneceu o antígeno fúngico utilizado em nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior pelo trabalho muito cuidadoso em fotografar nossas lâminas.

A equipe da Biblioteca da FMUSP, pela competência, rapidez e cuidado que dispensa aos alunos.

A Nanci Alves Salles, pela consideração e apoio dispensados, pois foram essenciais para a realização do meu trabalho.

A Ângela Maria Egydio de Carvalho Barreto, que teve comigo a mais nobre das virtudes: paciência. Serei sempre agradecida por toda sua compreensão.

Às colegas e amigas de 15 anos do Laboratório de Diagnóstico Sorológico da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo pelo apoio e incentivo.

A todos os amigos da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, que participaram, torceram, colaboraram comigo todo esse tempo.

A sempre amiga Ana Maria Solange do Val Ramos, que compartilhou e ainda compartilha comigo sua inteligência e carinho. Obrigada também por suas idéias sempre geniais.

A minha amiga Jotelma Leite Ribeiro por sua amizade e seus conselhos sempre tão preciosos. Você é muito querida.

Aos meus amigos da vida inteira, que participam de forma essencial, muitas vezes sem se dar conta de como são importantes para que nossos sonhos se realizem: Jandira e Marcelo Bregaida, Idely e Ricardo Bravo, Cibele Pejan, Cristina Sales.

A FAPESP, pela concessão do auxílio.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Lista de abreviaturas | |
| Lista de símbolos | |
| Resumo | |
| Summary | |
| INTRODUÇÃO..... | 01 |
| OBJETIVOS..... | 15 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 1-Casuística | 16 |
| 2-Antígenos utilizados | 17 |
| 2.1-Obtenção da glicoproteína de 43kDa a partir do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 17 |
| 2.2-Antígeno somático de <i>Candida albicans</i> (CSA)..... | 17 |
| 3-Separação e obtenção de células | 17 |
| 3.1-Obtenção de células mononucleares a partir de sangue periférico..... | 17 |
| 3.2-Obtenção de monócitos a partir de células mononucleares submetidas ao gradiente de densidade Percoll | 18 |
| 3.2.1-Análise fenotípica da suspensão celular enriquecida de monócitos | 19 |
| 3.3-Obtenção de linfócitos a partir de células mononucleares submetidas ao gradiente de densidade Percoll | 19 |
| 4-Cultura de células | 20 |
| 4.1-Cultura de linfócitos em garrafa | 20 |
| 4.2-Cultura de monócitos para diferenciação em células dendríticas..... | 20 |
| 5-Análise fenotípica das células dendríticas diferenciadas em cultura de 7 dias..... | 21 |
| 6-Adição dos antígenos gp43 do <i>P. brasiliensis</i> e antígeno somático de <i>C. albicans</i> (CSA) em cultura de células dendríticas..... | 21 |
| 7-Coleta de sobrenadantes das culturas em 18 horas após estímulo antigênico | 22 |
| 8-Análise das moléculas co-estimulatórias após estímulo antigênico..... | 22 |
| 9-Ensaio de fagocitose utilizando-se gp43 marcada com FITC..... | 22 |
| 10-Seleção negativa através de coluna para a retirada de linfócitos B e monócitos | |

| | |
|--|----|
| da suspensão de linfócitos | 23 |
| 11-Ensaio de linfoproliferação utilizando-se células dendríticas primadas | 24 |
| 12-Coleta de sobrenadantes dos ensaios de linfoproliferação após 72 horas de cultivo | 24 |
| 13-Análise da produção de citocinas através do método imunoenzimático (ELISA)..... | 25 |
| 14-Análise estatística | 25 |
| RESULTADOS | 27 |
| DISCUSSÃO | 43 |
| CONCLUSÕES | 51 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| A/Sn | camundongo isogênico A/Sn |
| AIDS | síndrome da imunodeficiência adquirida |
| APC | célula apresentadora de antígenos |
| B10.A | camundongo isogênico B10.A |
| BSA | albumina de soro bovino |
| CD | grupo de diferenciação |
| CPH | complexo principal de histocompatibilidade |
| cpm | contagens por minuto |
| CSA | antígeno somático de <i>Candida albicans</i> |
| DC | célula dendrítica |
| DD | dendrócitos dérmicos |
| ELISA | ensaio imunoenzimático |
| FcR | receptor de fração Fc de anticorpos |
| FCS | soro fetal enriquecido com ferro |
| FITC | isotiocianato de fluoresceína |
| GBO | granulomas bem organizados |
| GF | granulomas frouxos |
| GM-CSF | fator de crescimento para granulócitos e monócitos |
| gp43 | glicoproteína de 43 kDa |
| gp70 | glicoproteína de 70 kDa |
| HLA | antígenos leucocitários humanos |
| iDC | célula dendrítica imatura |
| IFN- γ | interferon gama |
| Ig | imunoglobulina |
| IL | interleucina |
| kDa | quilodalton |
| LPS | lipopolissacarídeo |
| mDC | célula dendrítica madura |
| moDC | célula dendrítica derivada de monócito |

Lista de abreviaturas

| | |
|------------------|--|
| MP65 | manoproteína de 65 kDa |
| mRNA | RNA mensageiro |
| Pb | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |
| PBMC | células mononucleares de sangue periférico |
| PBS | tampão salina fosfato |
| PCM | paracoccidioidomicose |
| PE | ficoeritrina |
| PGE ₂ | prostaglandina-E ₂ |
| TC | tricolor |
| TGF- β | fator transformador de crescimento beta |
| Th | linfócito T <i>helper</i> |
| TMB | tetrametilbenzidina |
| TNF- α | fator de necrose tumoral alfa |
| vs | <i>versus</i> |

Lista de símbolos

| | |
|----------|---|
| < | menor que |
| > | maior que |
| C | Celsius |
| <i>g</i> | 1g equivalente à aceleração da gravidade na superfície da terra |
| M | molar |
| mL | mililitro |
| mM | milimolar |
| N | normal |
| nm | nanômetro |
| pg | picograma |
| μCi | micro curie |
| μg | micrograma |
| μL | microlitro |
| μM | micromolar |
| μm | micrômetro |
| UI | unidade internacional |

Baida H. Importância das células dendríticas na resposta imune celular de pacientes com paracoccidiodomicose [dissertação]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP (Brazil); 2007.

A Paracoccidiodomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma importante micose endêmica na América Latina. Afeta principalmente trabalhadores rurais em idade produtiva. A doença é associada com vários graus de disfunções da imunidade celular de acordo com a severidade da apresentação clínica. Neste trabalho analisamos a atividade fagocítica, apresentação antigênica e a capacidade linfoproliferativa de células dendríticas derivadas de monócitos (moDC) *in vitro*, frente a glicoproteína de 43 kDa (gp43) do *P. brasiliensis*, um exoantígeno secretado pela parede do fungo que possui atividade proteolítica e o antígeno somático de *Candida albicans* (CSA) usado como controle. A suspensão de células enriquecida de monócitos foi obtida através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque/Percoll, utilizando-se amostras de indivíduos saudáveis e pacientes com PCM. Os monócitos foram então cultivados na presença do fator de crescimento para granulócitos e monócitos (GM-CSF) e interleucina-4 (IL-4). Após a diferenciação em células dendríticas (DC), foram realizados ensaios de fagocitose, estimulação antigênica, linfoproliferação e análise da expressão das moléculas de superfície CD14, CD11c, CD86, HLA-DR e CD1a por citometria de fluxo. Sobrenadantes foram coletados para análise da produção de citocinas. Os resultados obtidos sugerem que a gp43 inibe a ativação das DCs dos pacientes por um mecanismo que envolve diminuição da expressão de moléculas de superfície, causando disfunção na resposta imune associada com altos níveis de secreção de IL-10. As DCs de indivíduos saudáveis fagocitam a gp43 e apresentam o antígeno de forma eficiente, enquanto que as DCs dos pacientes apresentaram diminuição da função fagocítica. Por outro lado, foram encontrados altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) produzidos pelas DCs dos pacientes, havendo uma contribuição para a resposta inflamatória e imunidade inata de pacientes com PCM.

Descritores: Paracoccidiodomicose, micoses, fungos, citocinas, células dendríticas, trabalhadores rurais.

Baida H. The role of dendritic cells in cellular immune response of patients with paracoccidioidomycosis [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2007.

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is the most important endemic mycosis in Latin America. It affects rural workers at their productive period of life. PCM is associated with varying degrees of cellular immune dysfunction according to the severity of the clinical presentation. Here, we analyzed the phagocytic activity, antigen presentation and lymphoproliferation capacity of human monocyte-derived dendritic cells (moDC) *in vitro* challenged with the exoantigen 43 kDa of *P. brasiliensis* (gp43) and *Candida albicans* somatic antigen as control (CSA). The monocytes enriched suspension was obtained through gradient of Ficoll-Hypaque/Percoll density from health individuals and patients with PCM. The cells were cultivated in the presence of granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). After differentiation, DCs were stimulated with gp43 and CSA and analysed phagocytosis capacity. The following surfaces molecules such as CD14, CD11c, CD86, HLA-DR and CD1a were analyzed by flow cytometry. The supernatants were collected for cytokine analysis. In addition, we also verify the cellular morphology by microscopy examination. Taken together, these results suggest that *P. brasiliensis* inhibits activation of immature DC of patients by a mechanism that involves decreased expression of the surfaces molecules and this can result in dysfunction of the host-immune response, associated with and high levels of interleukin-10 (IL-10) secretion. The results suggest that health individuals' DC internalized gp43 and produced antigen presentation very efficient, while the patients' DC inhibits activation by a mechanism involving lesser expression of the surfaces molecules. On the other hand, the high levels of interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients' DC could contribute to inflammatory response and innate immunity in human PCM.

Descriptors: Paracoccidioidomycosis, mycoses, fungi, cytokines, dendritic cells, rural workers.

Introdução

Em 1908, Adolpho Lutz descreveu um fungo encontrado em cortes histológicos de casos submetidos à autópsia com características distintas do *Coccidioides immitis*. Este novo agente não apresentava esporulação endógena, e formas comumente encontradas em tecidos biopsiados (conídias) não foram observadas em cultura. Mais tarde em 1912, este fungo foi caracterizado por Floriano Paulo de Almeida, e atualmente está bem determinada sua relação como agente causal da paracoccidioidomicose (PCM) (Lacaz, 1993). Esta micose humana tem curso clínico sistêmico e diferentes perfis de apresentação clínica. O fungo recebeu então o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo um fungo dimórfico que se apresenta na forma miceliana à 25°C e como levedura à 37°C (Carbonell & Pollak, 1963).

Segundo Restrepo (1985), geograficamente a PCM é encontrada na América Latina, com áreas endêmicas que se estendem desde o México até a Argentina. Possui maior incidência no Brasil, Colômbia, Venezuela. No Brasil, a doença é mais freqüente nos estados do sul, sudeste e centro-oeste (Coutinho *et al.*, 2002).

O nicho natural do fungo ainda é desconhecido, mas sabe-se que o mesmo vive no solo na forma miceliana, podendo propagar-se por dispersão aérea, infectando assim por via respiratória animais como tatus e mais recentemente foi documentada em cães (Ferreira *et al.*, 1990; Silva-Vergara *et al.*, 2000; Ricci *et al.*, 2004). Desta forma, parece que estes animais participam como sinalizadores da presença do fungo no ambiente.

No homem, supõe-se também que o fungo tenha como porta de entrada as vias respiratórias, sendo este inalado e passando a infectar a mucosa orofaríngea (Wanke & Londero, 1993). Também são encontrados fungos em lesões periodontais e abscessos dentários, despertando assim o interesse também dos dentistas no estudo da doença (Lacaz, 1993).

A população infectada é composta por indivíduos de todas as idades, principalmente das áreas rurais. A doença ativa e progressiva ocorre geralmente em pacientes entre 30 e 50 anos de idade. A realização do teste de paracoccidioidina em regiões endêmicas revelou que casos de infecção subclínica variam entre 10,9% e 32,0% durante a primeira década da vida, aumentando bruscamente para 80,5% em indivíduos entre 15 e 19 anos de idade. As manifestações clínicas da doença são mais frequentes em indivíduos do sexo masculino, chegando a atingir de 80% a 90% dos casos. Essa frequência diminui em pacientes com menos de 30 anos, sendo as crianças de ambos os sexos afetadas (Wanke & Londero, 1993). A baixa incidência em mulheres está associada ao estrógeno, que parece ser um fator inibitório na conversão de conídias para a forma miceliana, conferindo uma proteção maior contra a instalação da infecção (Salazar *et al.*, 1988).

Com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a doença passou também a ser encontrada nesses pacientes como infecção oportunista, e em muitos casos em sua forma disseminada, levando os indivíduos a óbito (Benard & Duarte, 2000; Paniago *et al.*, 2005).

Após a infecção, o parasita começa sua multiplicação provocando a destruição do tecido afetado, formando assim a lesão primária. O fungo então é drenado para o linfonodo mais próximo, dando origem à lesão linfática satélite. Ambos os focos formam agora o complexo primário. A disseminação hematogênica ocorre simultaneamente, gerando focos metastáticos em outros órgãos. Neste período, não ocorrem sintomas ou sinais da doença. O hospedeiro sensibilizado desenvolve uma resposta imune celular específica detectável pelo teste cutâneo (Defaveri *et al.*, 1982).

Em resumo, o foco inicial pode regredir com a destruição do fungo e formação de cicatriz, podendo também ocorrer formação de um foco latente com fungos viáveis. A minoria dos pacientes infectados apresenta o curso agudo com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM. Assim, a doença foi classificada em duas formas: aguda (ou subaguda) e crônica. Porém no ano de 1986, durante o

Simpósio Pan-Americano de Paracoccidioidomicose em Medellín, foi proposta nova classificação:

PCM infecção: indivíduos aparentemente saudáveis, com teste cutâneo positivo, podendo apresentar ou não cicatriz radiológica pulmonar.

PCM doença:

-Forma aguda e sub aguda: grave, de evolução rápida. Os indivíduos apresentam altos níveis de anticorpos e baixa resposta imune celular. Compromete nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea. O subtipo moderado tem evolução mais lenta (Londero & Melo, 1983).

-Forma crônica: de progressão lenta e gradual. Pode ser leve, moderada ou grave. O subtipo unifocal acomete um único órgão ou sistema, apresentando níveis moderados de anticorpos e resposta imune celular moderadamente conservada. O subtipo multifocal acomete dois ou mais órgãos, com resposta imune celular e humoral variáveis.

-Forma residual ou seqüelar: sintomas e sinais decorrentes de seqüelas cicatriciais de lesões ativas pregressas (Montenegro, 1986; Franco *et al.*, 1987; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Em decorrência desta variabilidade de apresentações clínicas, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de caracterizar antígenos de *P. brasiliensis* que poderiam auxiliar no diagnóstico específico da doença, além de definir melhor a relação do sistema imune com o desenvolvimento de doença ou infecção (Mendes-Giannini *et al.*, 1989; Giannini *et al.*, 1990; Camargo *et al.*, 1991; Puccia & Travassos, 1991; Blotta & Camargo, 1993; Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Cisalpino *et al.*, 1996; McEwen *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2002). Entre os antígenos encontrados, destaca-se uma glicoproteína de 43kDa, um exoantígeno secretado pela parede do fungo em sua forma de levedura. Este antígeno foi primeiramente descrito por Yáñez *et al.* (1977) e posteriormente caracterizado quimicamente por Puccia *et al.* (1986, 1991), sendo denominado de gp43.

Estes autores demonstraram que a deglicosilação deste antígeno diminuía drasticamente reações sorológicas cruzadas com outras micoses, como a histoplasmose. A gp43 possui atividade proteolítica, facilitando a penetração do fungo nos tecidos, estando assim relacionada com a virulência. Entretanto, o papel dessa glicoproteína como fator de virulência apresenta controvérsia, sendo ainda alvo de estudos (Giannini *et al.*, 1990; Sano, *et al.*, 1997; San-Blas *et al.*, 2000).

Vicentini *et al.* (1994) estudando o papel da gp43 na patogenicidade da PCM, demonstraram a existência da interação gp43-laminina na célula hospedeira, como um importante mecanismo de invasão do fungo. Mendes-Giannini *et al.* (1994), demonstraram ser a gp43 a glicoproteína mais comumente reconhecida por soros de pacientes infectados com o *P. brasiliensis*, apresentando altos títulos de anticorpos. Em relação à resposta imune celular, Benard *et al.* (1997) estudaram o reconhecimento da gp43 e de uma glicoproteína de 70 kDa (gp70) por linfócitos de pacientes com PCM e indivíduos sadios sensibilizados ao fungo e observaram ser a gp43 um importante antígeno na resposta de linfócitos T, não apresentando reações cruzadas com outras micoses. Esse estudo revelou ainda depressão da resposta proliferativa nesses pacientes associadas a altos níveis de anticorpos anti-gp43, quando comparados com indivíduos sadios sensibilizados.

Calich *et al.* (1985) estudando camundongos de diversas linhagens, classificou-os em susceptíveis, intermediários, resistentes e muito resistentes ao fungo, com relação ao tempo de vida pós-inoculação intraperitoneal. Outros parâmetros estudados foram o sexo, anatomopatológico de tecidos contendo granulomas, imunidade humoral e variabilidade genética, encontrando-se por fim animais susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) ao *P. brasiliensis*.

Cano *et al.* (1995) demonstraram a existência de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção, independente da via de inoculação do fungo utilizada (intraperitoneal, intratraqueal ou intravenoso). Neste estudo, foi caracterizado que camundongos resistentes (A/Sn) inoculados com *P. brasiliensis* apresentam um aumento progressivo na quantidade de fungo nos pulmões após oitava semana, tendo

um decréscimo em seguida e não apresentam focos em outros órgãos. Em animais susceptíveis (B10.A) a disseminação do fungo para o baço e fígado foi evidente. Este quadro reforça que a resistência à infecção é determinada pela habilidade do sistema imune em restringir a disseminação do fungo a partir do foco inicial. Neste mesmo estudo, observando a resposta de hipersensibilidade tardia nesses animais, descreveram que camundongos resistentes desenvolvem significativa resposta após a quarta semana de infecção, mantendo-se assim nos estágios seguintes. Em contrapartida, animais susceptíveis desenvolvem discreta resposta na segunda semana e nos estágios subseqüentes comparados aos animais resistentes, sugerindo uma imunossupressão da resposta imune celular ou anergia.

Almeida *et al.* (1998), também em modelos experimentais, relacionaram o papel das células apresentadoras de antígeno na PCM experimental e observaram que em animais susceptíveis (B10.A) a apresentação antigênica ocorre predominantemente por linfócitos B, enquanto em animais resistentes (A/Sn) a apresentação ocorre predominantemente por macrófagos.

Ainda em relação à imunidade celular, Flavia Popi *et al.* (2002) estudando macrófagos peritoneais de camundongos A/Sn e B10.A descreveram a interação entre as moléculas de superfície do parasita e receptores homólogos contidos nos macrófagos, e a importância da gp43 como possível mecanismo de evasão do sistema imune. Estes autores observaram alta concentração de manose no fungo, que regula a fagocitose e ainda que o evento fagocítico é inibido quando é acrescentada gp43 ao meio de cultura de células pré-estimuladas com o fungo. Observaram ainda que a gp43 bloqueia também a internalização de zymosan, a produção de óxido nítrico (NO) e a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelos macrófagos das duas linhagens de camundongos.

Também em modelos experimentais, outros estudos demonstraram que macrófagos de camundongos resistentes produzem quantidades significantes de H₂O₂ que se relacionam com o decréscimo na quantidade de fungos nos pulmões. Estas células quando ativadas por interferon- γ (IFN- γ) são competentes na eliminação do

fungo, mas essa atividade é independente da produção de H_2O_2 . Animais susceptíveis apresentam um quadro inverso, demonstrando que a resposta imune celular parece estar inibida (Calich & Kashino, 1998).

Desde a descrição dos padrões T *helper* 1 (Th-1) e T *helper* 2 (Th-2) por Mosmann *et al.* (1991) e seu envolvimento com a susceptibilidade e resistência na leishmaniose, caracterizando duas populações celulares nas quais a resposta do tipo Th-1 estava envolvida com resistência à infecção e produção de IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e IL-12 e a resposta do tipo Th-2 envolvida com susceptibilidade e produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, vários estudos tem demonstrado a importância de citocinas, tais como IFN- γ , na resistência à várias doenças infecciosas (Zhang *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1995; Pie *et al.*, 1997). Na PCM experimental Cano *et al.*, (1998) observaram que IFN- γ aumenta a resposta frente ao fungo, ativando macrófagos e regulando a expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (CPH). Modula também a troca para a subclasse de imunoglobulina (Ig) IgG_{2a}, que aparece em níveis elevados juntamente com IgG₃ em animais resistentes, demonstrando a predominância de resposta Th-1 e consequente resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*. Em animais susceptíveis, observam-se altos níveis de IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b}. IL-4 participa da troca para a subclasse IgG₁ e também regula a expressão de moléculas classe I do CPH e induz baixa resposta celular frente ao fungo. O fator transformador de crescimento beta (TGF- β) induz a troca para a subclasse IgG_{2b} e também inibe resposta celular. Com isso, fica evidente o predomínio de resposta Th2 em animais susceptíveis, com baixa resposta celular e possível desenvolvimento de anergia.

Em estudo da imunidade celular na PCM humana, Benard *et al.* (2001) observaram este mesmo predomínio da resposta do tipo Th-2 em pacientes com a doença ativa, ao detectar em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes estimuladas com gp43, altos níveis de IL-10 e níveis muito reduzidos ou indetectáveis de IL-2 e IFN- γ , quando comparados com indivíduos curados. Este mesmo grupo já havia investigado a relação entre a produção de anticorpos frente à gp43 e um antígeno somático de *P. brasiliensis* e as

formas clínicas da doença, observando que a troca para subclasses de IgG na PCM parece estar regulada pelo padrão de citocinas predominante no microambiente (Baida *et al.*, 1999; Juvenale *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram observados por Karhawi *et al.* (2000), que demonstraram da mesma forma que a produção reduzida de IFN- γ por células de pacientes com PCM ativa foi restaurada após tratamento. Oliveira *et al.* (2002) verificaram nesse trabalho baixos níveis de IL-2 e IFN- γ *in vitro* por células de pacientes com a forma aguda e crônica da doença e altos níveis de IL-10.

Estudos de nosso grupo revelaram ainda a importância da IL-10, predominantemente produzida por monócitos de pacientes com PCM na imunossupressão da resposta celular, uma vez que a neutralização desta citocina foi capaz de aumentar a resposta linfoproliferativa e os níveis de IFN- γ pelas células de indivíduos com a doença ativa. Observaram ainda que a associação da neutralização da IL-10 com a IL-12 recombinante apresentou efeito aditivo na resposta proliferativa e na produção de IFN- γ pelas células de pacientes quando comparada com as células de controles curados da PCM (Benard *et al.*, 2001; Romano *et al.* 2002). Mais recentemente, Romano *et al.* (2005) estudando a modulação da resposta imune celular na PCM humana, observaram que células de pacientes com doença ativa apresentaram baixos níveis de IL-12 e expressão diminuída da subunidade $\beta 2$ do receptor desta citocina, comprometendo a ativação de linfócitos e contribuindo para imunossupressão celular.

Calvi *et al.* (2003) demonstraram o efeito das citocinas na ativação de monócitos, sendo que IFN- γ afeta a atividade fungicida dessas células frente a algumas cepas de alta (Pb18) e baixa virulência (Pb265). As células apresentam alta produção de H₂O₂ *in vitro*, sendo este metabólito responsável pela eficiência dessas células humanas em eliminar o fungo. Também foi encontrado pelo mesmo grupo altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em sobrenadantes de células de pacientes pré-ativadas com IFN- γ e incubadas com a cepa Pb265. Vários trabalhos têm indicado que TNF- α ativa macrófagos peritoneais pré-ativados com IFN- γ , tornando essas células mais eficientes em atacar e destruir *Leishmania major* (Green

et al., 1990), *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* (Langermans *et al.*, 1992), *Histoplasma capsulatum* (Wu-Hsieh *et al.*, 1992). Além disso, o efeito sinérgico dessas citocinas ativa monócitos do sangue periférico contra *Leishmania donovani* (Reiner *et al.*, 1990), *Coccidioides immitis* (Beaman, 1991), *Legionella pneumophila* (Matsiota-Bernard *et al.*, 1993).

Estudando ainda a produção espontânea de citocinas por monócitos de pacientes, Peraçoli *et al.* (2003) demonstraram que a produção de citocinas (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e TGF- β 1) por essas células mostrou-se significativamente alta em relação aos indivíduos controle, mesmo sem estímulo antigênico em cultura. Esse quadro sugere o intenso estado inflamatório que se encontra os pacientes comparados aos indivíduos saudáveis. A alta produção de IL-6 indica seu envolvimento na neutralização dos efeitos tóxicos do TNF- α , bem como na ativação de linfócitos B e produção de anticorpos que são encontrados em altos níveis na PCM ativa. O TGF- β possui efeito inibitório sobre as células do sistema imune e associado ao aumento da IL-10, pode estar inibindo a produção de IFN- γ e IL-2. Nesse mesmo estudo, quando as células dos indivíduos controle são estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), as mesmas apresentam aumento significativo na produção de citocinas, sendo que as células dos pacientes não apresentaram alterações significativas, corroborando com a literatura em relação a pacientes em choque séptico e infecções severas sendo estes não respondedores a LPS (Randow *et al.*, 1995; Astiz *et al.*, 1996).

Todos esses resultados reforçam o papel da IL-12 e IFN- γ na defesa contra patógenos intracelulares. No entanto, além de monócitos e macrófagos, fica evidente a importância da célula dendrítica (DC) no direcionamento e manutenção de perfis distintos de resposta imune em doenças infecciosas. Alguns patógenos intracelulares induzem diretamente a produção de IL-12, porém outros agentes, como por exemplo a *Leishmania major*, produzem fatores inibitórios de IL-12 e induzem a produção de IL-10 (Kalinski, 1999). A capacidade de DCs em produzir IL-12 depende de fatores encontrados no microambiente tecidual. Estas células, quando estimuladas por IFN- γ em sua fase imatura, irão tornar-se preferencialmente células maduras produtoras de

IL-12, enquanto que DCs que sofrem estímulos de prostaglandina E₂ (PGE₂) e IL-10, produzem baixas quantidades de IL-12 em sua fase madura (Kalinski, 1999).

A primeira descrição morfológica de células fagocíticas ocorreu em 1868, observando-se tecido de origem epitelial. Estas células receberam então o nome de seu descobridor, o patologista alemão Paul Langerhans (1847-1888). Segundo Banchereau *et al.* (1998), somente 25 anos depois as DCs foram caracterizadas. Sua principal função é ser uma célula apresentadora de antígenos profissional (APC). São responsáveis por induzir resposta imune primária, permitindo o estabelecimento de memória imunológica. Estas células representam uma população celular heterogênea, residindo em vários tecidos do organismo, principalmente a pele, mucosas e órgãos linfóides (Banchereau *et al.*, 2000). Sua denominação deve-se à formação de finos dendritos em sua membrana citoplasmática, que podem chegar a 10 µm. Por conseguinte, sua função de célula apresentadora é facilitada, bem como sua motilidade (Winzler, 1997).

Em modelos experimentais, as células podem ser basicamente de duas origens: mielóide e linfóide. Estudos mostram que células de origem linfóide são originadas a partir de uma população de células pré-T CD44+CD25+CD3- (Wu *et al.*, 1996; Shortman *et al.*, 1998). Foram caracterizadas duas subclasses de DCs em camundongos: DC CD8α+ que estariam envolvidas com a indução da resposta do tipo 1 enquanto DC CD8α- estariam envolvidas com a resposta do tipo 2 (Smith *et al.*, 1999; Maldonado-Lopes *et al.*, 1999).

Em humanos, a partir de uma célula progenitora hematopoiética CD34+, originam-se precursores no sangue periférico que, sob o estímulo de fatores de crescimento e citocinas do microambiente celular, geram DCs que possuem capacidade fagocítica e apresentação antigênica. Dois subgrupos de células precursoras foram caracterizados: monócitos CD14+CD11c+ e outro grupo formado por células CD11c- IL-3Rα+, conhecidas como DCs de origem plasmocitóide – pDC (Grouard *et al.*, 1997).

Em modelos humanos, para a caracterização de células de origem mielóide a partir de sangue periférico e seu cultivo *in vitro*, utiliza-se fator de crescimento para granulócitos e monócitos (GM-CSF) e citocinas (IL-4 ou TNF- α) que promovem a diferenciação de monócitos em células dendríticas (moDC) (Romani *et al.*, 1994).

Com relação à expressão de CD1a, uma molécula responsável por reconhecer antígenos lipídicos, Gogolak *et al.* (2006) esclarece que células de Langerhans são CD1a+, enquanto que DCs originadas de monócitos são basicamente CD1a-. A diferenciação *in vitro* das DCs pode ser manipulada, adicionado-se ao meio de cultura TGF- β 1 ou substituindo-se IL-4 por TNF- α , fazendo assim com que as células passem a expressar este receptor. A concentração de soro no meio de cultura também pode influenciar a expressão de CD1a.

Shortman & Liu (2002) descreveram células dendríticas imaturas (iDCs) encontradas em tecidos não-linfóides, que apresentam a capacidade de processar antígenos, mas não de interagir com células T. Esse mesmo grupo relata a presença de células dendríticas maduras (mDC) que expressam altos níveis de moléculas classe II do CPH e de moléculas co-estimulatórias, podendo desta forma interagir com as células T e direcionar a resposta imune ainda no sítio de infecção inicial. Observaram que as iDCs funcionam como sentinelas nos tecidos, que em contato com antígenos promovem o processamento destes, deslocando-se via vasos linfáticos para os órgãos linfóides secundários, onde irão interagir na zona T desses órgãos com a subpopulação de linfócitos T conhecida como células T auxiliares, tornando-se assim uma mDC. Ao atingir o estágio de célula madura, diminuem drasticamente sua capacidade fagocítica, porém tornam-se APCs profissionais. A síntese e a renovação das moléculas do CPH são bloqueadas à medida que essas células migram para os linfonodos e iniciam sua diferenciação, fazendo com que o complexo CPH-peptídeo, presente na superfície celular, permaneça cerca de 10 vezes mais tempo exposto, tornando a DC uma excelente célula apresentadora (Moll, 2003).

Allavena *et al.* (1998) avaliando o papel da IL-10 sobre as DCs humanas demonstraram que esta citocina promove a diferenciação de monócitos em

macrófagos e inibe a maturação dos mesmos em DCs. Ainda neste estudo, observaram que DCs quando expostas precocemente a IL-10, adquirem a morfologia e fenótipo de macrófagos e que esta citocina inibe também a síntese de IL-1, IL-6, GM-CSF e TNF- α , importantes na diferenciação das DCs. Ainda estudando DCs humanas e o papel da IL-10, McBride *et al.* (2002) demonstraram, através do estímulo para maturação com LPS, que a presença desta citocina induz mudança das moléculas de superfície, tais como CD1a, CD80, CD86 e o antígeno leucocitário humano (HLA) HLA-DR, causando uma diminuição em sua expressão. Com relação à produção de citocinas pelas DCs, inibe a produção de TNF- α e IL-12, interferindo indiretamente na ativação das células T.

Newman *et al.* (2001), em modelos de doenças fúngicas, demonstraram a eficiência das DCs frente a *Candida albicans*. Estas células foram capazes de reconhecer, fagocitar e apresentar o fungo para células T e apresentaram ainda importante mecanismo fungicida. Na aspergilose experimental, Bozza *et al.* (2002) demonstraram que estas células são capazes de internalizar tanto hifas como conídios e produzir diferentes perfis de citocinas frente a estes antígenos.

Richards *et al.* (2002), em estudo com o fungo *C. immitis*, observaram que as DCs estão também envolvidas com a tolerância central de células T, induzindo a morte por apoptose de células auto-reativas, produzindo uma resposta anérgica ou gerando células T regulatórias. Essa capacidade de induzir tolerância ou desencadear uma resposta imune depende da maturidade ou estágio de ativação da célula dendrítica.

Na PCM humana, pouco se sabe a respeito do papel das DCs na indução e manutenção da resposta imune celular. Estudo de Almeida *et al.* (2001) demonstrou uma baixa eficiência na apresentação da gp43 de *P. brasiliensis* tanto por DCs como por macrófagos de camundongos susceptíveis, quando comparada com a capacidade de apresentação em camundongos resistentes.

Mais recentemente, Pagliari *et al.* (2002) estudando o padrão de células envolvidas na resposta imune ao *P. brasiliensis* em lesões da pele, encontrou dendrócitos dérmicos (DD) Fator XIII a+ envolvidos na formação de granulomas, bem como na apresentação dos antígenos aos linfócitos T. Estas células apresentaram-se hipertróficas e hiperplásicas, expressando HLA-DR e continham fungos em seu citoplasma, cumprindo assim não só sua função fagocítica, mas também sua função de célula apresentadora aos linfócitos T que chegam ao redor dos granulomas. Neste mesmo estudo, o grupo de pacientes apresentou achados histológicos de granulomas bem organizados (GBO), outros com granulomas frouxos (GF) e um grupo de pacientes com ambos os padrões (GBO/GF). Em pacientes com GBO os DDFXIIIa+ secretam TNF- α quando estimuladas com IFN- γ , auxiliando na formação de granulomas. O grupo que apresentava GBO/GF exibiu maior expressão de IL-10, citocina padrão Th-2. Sendo assim, indivíduos que apresentam GBO, possuem maior expressão de IFN- γ , enquanto que o grupo com GF apresentam maior expressão de IL-5 e IL-10. No grupo de pacientes com resposta mista (GBO/GF) as DDFXIIIa+ podem estar provendo o tecido de células de Langerhans, sendo precursoras das mesmas.

Estudando a presença de citocinas em lesões cutâneas na PCM, Pagliari *et al.* (2003) observaram a presença de dendrócitos dérmicos e células de Langerhans expressando TNF- α e IFN- γ no infiltrado inflamatório, associadas a linfócitos expressando IL-5 e IL-10, demonstrando assim o envolvimento desse tipo de célula apresentadora na formação da resposta inflamatória frente ao fungo.

Recentemente, Wozniak *et al.* (2006) em estudo com modelo murino, demonstraram que a DC pulmonar possui a capacidade de fagocitar o fungo *Cryptococcus neoformans*, apresentando aumento na expressão de CD11c, CPH classe II, CD80 e CD86 sendo que, 7 dias após a inoculação do fungo, os animais infectados continuaram apresentando aumento na expressão de CD80, comparados com os animais controle. Neste mesmo estudo, experimentos *ex vivo* comprovaram que as DCs foram capazes de fagocitar o fungo após 1 hora de incubação. Mais tarde, foram observadas as mesmas células apresentadoras isoladas após diferentes tempos

de exposição ao fungo. Foram então incubadas com hibridomas de células T específicos para o agente em questão. A produção de IL-2, observada quando da análise de sobrenadantes das culturas, indica a ativação dos linfócitos T antígeno específicos, resultado da apresentação antigênica realizadas pelas DCs pulmonares.

Em PCM, Ferreira & Almeida (2006), em estudo com camundongos, demonstraram que a presença da gp43 provoca uma diminuição na expressão de moléculas de superfície tais como CPH classe II, CD80, CD40, CD86 e CD54 nas iDCs de camundongos susceptíveis. Estas células, quando sofreram maturação na presença de LPS e gp43, apresentaram diminuição ainda maior na expressão destes receptores. Ainda neste estudo, animais foram imunizados com DCs primadas com LPS e gp43, e após 7 dias os linfonodos sofreram re-estimulação *in vitro* com gp43. Foram observados nos sobrenadantes a presença de IFN- γ , IL-10 e IL-4, sugerindo o predomínio de uma resposta Th-0. Observando-se os granulomas destes animais imunizados com DCs primadas com gp43, estes mostraram-se desorganizados, facilitando a disseminação da doença. Curiosamente, camundongos A/J, resistentes à doença, apresentaram granulomas com o mesmo padrão morfológico encontrado nos animais susceptíveis. Os resultados sugerem a participação efetiva da gp43 na instalação da doença, visto que a glicoproteína estudada parece interferir na expressão dos receptores de superfície essenciais na ativação dos linfócitos T e instalação de uma resposta imune realmente efetiva.

Pietrella *et al.* (2006), em estudo com *C. albicans*, observaram que utilizando-se de uma manoproteína de 65 kDa proveniente da parede do fungo (MP65), conhecida por promover um resposta inflamatória do tipo Th-1, observaram em DCs humanas um aumento na produção de TNF- α , IL-6 e do RNA mensageiro (mRNA) para IL-12 após 6 horas de tratamento, favorecendo a maturação de DC a ativação de células T.

Adicionalmente, alguns estudos em doenças fúngicas têm estabelecido a importância da célula dendrítica na indução de uma resposta protetora Th-1 e como proposta de vacina. Neste contexto, Richards *et al.* (2002) propõe o modelo com o

fungo *C. immitis*, estudando indivíduos saudáveis e pacientes com coccidioidomicose disseminada. Demonstraram que pacientes com a doença disseminada conseguem gerar *in vitro* DCs com fenótipo, genótipo e funções normais, comparadas com células de indivíduos controle. Estas células apresentaram expressão de HLA-DR, CD54, CD80, CD86, CD1a e quando são maturadas na presença de TNF- α e PGE₂, apresentaram significativo aumento na expressão destas moléculas, com exceção de CD1a. As células foram então pulsadas com o antígeno T27K e cocultivadas com células autólogas. Observou-se nestes ensaios que, tanto as células dos pacientes com a doença disseminada quanto células dos indivíduos não imunizados induziram resposta, surgindo assim uma esperança de vacina, utilizando-se de DCs autólogas.

Em modelo experimental, Bozza *et al.* (2002) propuseram a utilização de CpG não metilado como adjuvante na produção de uma vacina frente a aspergilose pulmonar invasiva, causada pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, utilizando-se o alérgeno Asp f 16. Foram observados resultados que mostram o desenvolvimento de resistência à infecção em animais que receberam o alérgeno combinado ao adjuvante, comparados aos animais em que foram administrados somente alérgeno, ou adjuvante separadamente. A proteção foi correlacionada com a ativação das DCs, produção de IL-12 e IFN- γ e intensa linfoproliferação. As células mostraram-se eficientes na produção de uma resposta imune satisfatória e resistência ao fungo, bem como frente a alérgenos.

Desta forma, o estudo do papel da célula dendrítica na indução e manutenção de uma resposta imune celular eficiente na PCM humana apresenta-se de grande relevância.

Objetivos

Objetivo Geral:

→ Padronizar a obtenção de células dendríticas (DCs) a partir de monócitos de sangue periférico e estudar a influência dessas células na resposta imune celular de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) e em indivíduos saudáveis.

Objetivos Específicos:

→ Verificar a capacidade de fagocitose e apresentação de antígenos por DCs diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis;

→ Verificar a produção de citocinas como IL-12, TNF- α , IL-10 e IFN- γ e a capacidade proliferativa de linfócitos de pacientes com PCM e de indivíduos saudáveis, cultivados com DCs na presença de antígeno de *C. albicans* e gp43 de *P. brasiliensis*.

Material e métodos

1-Casuística:

Foram estudados 14 pacientes com a forma ativa da doença, confirmada pelo isolamento de fungos a fresco retirados das lesões ou ainda pelo teste sorológico positivo para PCM, sendo 13 do sexo masculino e um do sexo feminino, com idades entre 12 e 76 anos (**Quadro 1**). Os pacientes foram provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Disciplina de Dermatologia e do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Juntamente com os pacientes, foram estudadas 21 amostras de indivíduos saudáveis provenientes do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências da FMUSP, Laboratório de Investigação Médica 56 (LIM-56). A punção venosa de 40 mL foi realizada com consentimento prévio dos mesmos, com risco mínimo durante o procedimento de acordo com resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Quadro 1: Perfil dos pacientes com PCM. Sorologia indica título de anticorpos anti-*P.brasiliensis* detectados na contraímunoelctroforese (CIE). F = sexo feminino; M = sexo masculino; C = forma crônica; A = forma aguda; NF = dado não fornecido.

| Número | Paciente | Idade | Sexo | Forma clínica | Sorologia (CIE) |
|--------|----------|-------|------|---------------|-----------------|
| 1 | JCP | 76 | M | C | 1:8 |
| 2 | JN | 54 | M | C | NF |
| 3 | PP | 64 | M | C | 1:2 |
| 4 | ML | 39 | M | C | 1:2 |
| 5 | ACS | 39 | M | C | 1:8 |
| 6 | SSS | 12 | F | A | NF |
| 7 | LAVB | 33 | M | C | 1:16 |
| 8 | IVS | 34 | M | C | NF |
| 9 | JDS | 64 | M | C | 1:32 |
| 10 | MSS | NF | M | C | NF |
| 11 | CVS | 57 | M | C | 1:16 |
| 12 | AJS | 20 | M | A | NF |
| 13 | CMB | 47 | M | C | 1:256 |
| 14 | JSA | NF | M | C | 1:2 |

2-Antígenos utilizados:

2.1-Obtenção da glicoproteína de 43kDa a partir do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*:

A extração e purificação da glicoproteína de 43 kDa (gp43) foi realizada no Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de São Paulo - UNESP - Campus Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini, descrito em Giannini *et al.* (1990) e gentilmente cedido para a realização de nossos ensaios.

2.2-Antígeno somático de *Candida albicans* (CSA):

O antígeno somático de *Candida albicans* (BioRad Fujirebio, Tokio, Japão) foi utilizado como antígeno controle nos ensaios de cultura celular, na concentração de (5µg/mL), da mesma forma que em estudos anteriores (Benard *et al.*, 2001).

3-Separação e obtenção de células:

3.1-Obtenção de células mononucleares a partir de sangue periférico:

Foi utilizado o volume mínimo necessário de 40 mL de sangue periférico heparinizado de pacientes e doadores voluntários para a obtenção de células mononucleares, que foram isoladas através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Sweden). O sangue foi diluído em solução salina (Baxter Hospitalar, Brasil) na razão 1:1 e em seguida foi adicionado lentamente a um tubo cônico de 50 mL (Costar, Cambridge, MA, USA) contendo 1/3 do volume total de Ficoll-Hypaque. Em seguida, o tubo foi submetido à centrifugação por 20 minutos a

400 g. Obteve-se o anel de células mononucleares que foi retirado com pipeta de transferência estéril por raios gama, apirogênica (Alfaplast, Brasil) e lavado por duas vezes com RPMI (Cultilab, Brasil) suplementado com 40 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brasil), 200 mM/mL de glutamina (Sigma, St.Louis, MO, USA), centrifugando-se por 7 minutos a 150 g. Procedeu-se a contagem do número total de células em contador automático (Cell-Dyn 1400) e em seguida foi realizada a avaliação da viabilidade celular com o corante Azul de Tripán (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.2-Obtenção de monócitos a partir de células mononucleares submetidas ao gradiente de densidade Percoll:

O protocolo para a obtenção de monócitos de sangue periférico foi desenvolvido a partir de trabalhos preliminares baseados na separação por diferentes gradientes de densidade (Almeida *et al.*, 2000; Replik *et al.*, 2003; Lehner *et al.*, 2005). Após a contagem das células mononucleares, ressuspendeu-se as mesmas em RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL), com volume final de 3 mL. A seguir foram submetidas ao gradiente de densidade com Percoll (Labtrade do Brasil), sendo utilizado 10 mL de Percoll hiper osmótico - 10% NaCl 1,6 M (Sigma, St.Louis, MO, USA), 48,5% Percoll, 41,5% H₂O MiliQ - adicionado ao tubo cônico de 50 mL e em seguida, lentamente, adicionou-se as células em suspensão. Centrifugou-se por 15 minutos a 250 g. As células que permaneceram em suspensão foram coletadas utilizando-se pipetas de transferência, compondo uma solução celular enriquecida de monócitos. Procedeu-se à nova lavagem, utilizando-se RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL), por 7 minutos a 150 g. Em seguida foi feita a contagem celular em contador automático (Cell-Dyn 1400). A seguir foi realizada avaliação da viabilidade celular com o corante Azul de Tripán (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.2.1-Análise fenotípica da suspensão celular enriquecida de monócitos:

Para a necessária comprovação do método de obtenção de monócitos através do gradiente de Percoll, a suspensão celular foi analisada através da marcação com o anticorpo anti-CD14, comprovando o rendimento da técnica. A marcação foi feita primeiramente incubando-se 1×10^6 células/mL por 20 minutos a 2-8°C com imunoglobulina intravenosa humana (Endobulin®, Baxter Immuno, Áustria), para o bloqueio dos receptores para fração Fc (FcR) presentes nas células. Em seguida procedeu-se à incubação durante 20 minutos a 2-8°C e protegida da luz, com o anticorpo monoclonal anti-CD14 (Caltag, CA, USA) e controle isotípico IgG2a (Caltag, CA, USA). A seguir as células foram lavadas com PBS-Azida por 1 minuto a 5000 g. Finalmente foi feita a análise no citômetro de fluxo (Epics XL- Coulter).

3.3-Obtenção de linfócitos a partir de células mononucleares submetidas ao gradiente de densidade Percoll:

Assim como as células em suspensão foram recolhidas, as células que compunham o sedimento, enriquecido de linfócitos, também foram coletadas. Procedeu-se à lavagem das células, utilizando-se RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL) e glutamina (200 mM/mL), por 7 minutos a 150 g, procedendo-se em seguida à contagem celular. Esta suspensão de células foi mantidas em cultivo utilizando-se garrafas contendo RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL), e 10% de soro AB (HyClone, Utah, USA), para posterior utilização em ensaios de linfoproliferação. A viabilidade celular foi avaliada através da coloração com Azul de Tripan. (Sigma, St. Louis, MO, USA).

4-Cultura de células:

4.1-Cultura de linfócitos em garrafa:

Para os linfócitos mantidos em cultura utilizou-se meio RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL), e 10% de soro AB durante 8 dias a 37°C e 5% CO₂, trocando-se o meio a cada 3 dias. Utilizou-se garrafas para a cultura de 50 mL (Costar, Cambridge, MA, USA).

4.2-Cultura de monócitos para diferenciação em células dendríticas:

Segundo estudos anteriores (Romani *et al.*, 1994; Anton *et al.*, 1998; Allavena *et al.*, 1998; Ebner *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2002; Dauer *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003; Lehner *et al.*, 2005) as células de indivíduos saudáveis foram submetidas a culturas de 7, 9 e 11 dias, sob as mesmas condições, para a determinação do tempo ótimo de cultura. Determinou-se que o sétimo dia foi o tempo ótimo para diferenciação, com médias de expressão de CD11c de 75%, analisados por citometria de fluxo (vide resultados). A concentração utilizada para a cultura de monócitos foi de 1×10^6 céls/mL. Utilizou-se placas de cultura de poliestireno com seis orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA), onde as células foram ressuspensas em RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL), 2-Mercaptoetanol (5 µM/mL) (Merck, USA), 1% de aminoácidos não essenciais (HyClone, Utah, USA), 10% de soro fetal enriquecido com ferro (FCS) (HyClone, Utah, USA), 1000 UI de IL-4 (R&D, MN, USA), 1000 UI de GM-CSF (R&D, MN, USA). As células permaneceram em cultura por 7 dias a 37°C com 5% CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 dias.

5-Análise fenotípica das células dendríticas diferenciadas em cultura de 7 dias:

Para a análise do fenótipo celular que caracteriza a célula dendrítica, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-receptores de superfície, característicos deste tipo celular. Por serem APCs profissionais, estas apresentam inúmeros receptores correspondentes, sendo que foram selecionados os seguintes marcadores, baseando-se em estudos prévios (Olweus *et al.*, 1997; Allavena *et al.*, 1998; McBride *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2002): CD1a, HLA-DR, CD11c e CD86, bem como foi selecionado um receptor que esta APC em questão não expressa de maneira representativa: CD14. Após o tempo de cultura previamente estabelecido, as células foram retiradas da placa através da adição de RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL) gelado e utilização de *scraper* (Costar, Cambridge, MA, USA). Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 100 g. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em PBS-Azida. A primeira incubação de 20 minutos a 2-8°C foi feita com imunoglobulina intravenosa humana (Endobulin®, Baxter Immuno, Áustria). Em seguida, procedeu-se à incubação durante 20 minutos a 2-8°C protegida da luz, com os anticorpos monoclonais e controles isotípicos correspondentes (Caltag, CA, USA): anti- CD1a (ficoeritrina – PE), CD14 (tricolor – TC), HLA-DR (TC), CD11c (isotiocianato de fluoresceína – FITC) e CD86 (FITC). Após o tempo de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS-Azida por 1 minuto a 5000 g. Por fim foram ressuspensas em 1 mL de PBS-Azida a analisadas por citometria de fluxo (Epics- XL, Coulter). Paralelamente, foi feita análise morfológica por microscopia óptica, utilizando lâminas de vidro (GlassTécnica, Brasil) e coloração hematoxilina-eosina.

6-Adição dos antígenos gp43 de *P. brasiliensis* e antígeno somático de *C. albicans* (CSA) em cultura de células dendríticas:

Após a análise fenotípica comprobatória da expressão de receptores característicos de DCs, foram adicionadas às culturas os antígenos gp43 de

P.brasiliensis (33 µg/mL) e o CSA (5 µg/mL). Em seguida, as culturas foram mantidas a 37°C em estufa (Forma Scientific, Inc., USA) com 5% de tensão de CO₂ por 24 horas. Para cada antígeno foram utilizados 2 orifícios da placa de cultura. O primeiro orifício foi utilizado para a análise fenotípica dos receptores após estímulo antigênico, e o segundo orifício foi utilizado para o ensaio de linfoproliferação com células dendríticas primadas. Mantivemos um orifício da placa com células não estimuladas usadas como controle basal.

7-Coleta de sobrenadantes das culturas em 18 horas após estímulo antigênico:

Para a análise da produção de citocinas pelas DCs após exposição ao estímulo antigênico, foram coletadas amostras de sobrenadantes das culturas de pacientes e indivíduos controle. As células que permaneceram sem estímulo compõem nosso controle basal. Foram coletadas amostras com 18 horas após a adição dos antígenos descritos anteriormente, para a dosagem de IL-10, IL-12 e TNF- α .

8-Análise das moléculas co-estimulatórias após estímulo antigênico:

Transcorridas 24 horas após a adição dos antígenos nas culturas de DCs, as mesmas foram retiradas da placa de cultura e analisadas. O procedimento foi o mesmo descrito no item 5.

9-Ensaio de fagocitose utilizando-se gp43 marcada com FITC:

Utilizando-se DCs obtidas em cultura por 7 dias, foram realizados ensaios de fagocitose para a análise da capacidade destas células apresentadoras em fagocitar eficazmente o antígeno do fungo *P. brasiliensis* utilizado em nosso trabalho. A técnica segundo Persat & Noirey (2003) constituiu-se em diluir a gp43 (10 µg/mL)

em bicarbonato de sódio e em seguida adicionou-se FITC (Molecular Probes, Oregon, USA) na razão 1:10. Incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação constante. As células foram então coletadas como descrito no item 5. Após o procedimento de lavagem e contagem das mesmas, a concentração usada foi de 1×10^6 céls/mL. As DCs foram incubadas com a gp43 marcada com FITC e com Dextran (Molecular Probes, Oregon, USA) servindo de controle positivo, a 37°C por 1 hora e por 24 horas em agitação constante. Células não marcadas foram utilizadas como controle negativo. Após o tempo de incubação, foram lavadas com PBS-Azida por 1 minuto a 5000 g. Finalmente adicionou-se 20 µL de Azul de Tripán e incubou-se por 10 minutos para minimizar a presença de possível fluorescência inespecífica. Procedeu-se a duas lavagens de 1 minuto a 5000 g e feita análise realizada por citometria de fluxo.

10-Seleção negativa por meio de coluna para a retirada de linfócitos B e monócitos da suspensão de linfócitos:

Os linfócitos mantidos em cultura foram submetidos ao processo de seleção negativa para retirada de células B e monócitos através da utilização de coluna (R&D, USA, MN), obtendo-se um eluato enriquecido de linfócitos CD3 positivos. Os linfócitos mantidos em cultura foram retirados da garrafa com o auxílio de pipetas de transferência e colocados em tubos de vidro para serem lavados por 10 minutos a 100 g. Simultaneamente, a coluna foi previamente lavada com tampão fornecido pelo fabricante. Após a lavagem das células, estas foram ressuspensas em 2 mL do mesmo tampão. A seguir, a solução de células foi lentamente pipetada no ápice da coluna. A incubação ocorreu à temperatura ambiente por 10 minutos. O eluato obtido após a passagem das células pela coluna foi recolhido dentro de um tubo cônico de 15 mL (Costar, Cambridge, MA, USA). Após o término desta etapa, quatro alíquotas de 2 mL do tampão foram lentamente pipetadas no ápice da coluna, para total passagem das células pela mesma. Novamente as células não retidas foram recolhidas. Por fim, nova lavagem das células depletadas de linfócitos B foi feita por 10 minutos a 100 g. Ressuspendeu-se os linfócitos em RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL),

glutamina (200 mM/mL), 10% soro AB e foi feita a contagem do número geral de células. O processo de seleção negativa utilizado recupera cerca de 37% a 54% das células submetidas ao procedimento, enquanto a purificação varia de 87% a 95%.

11-Ensaio de linfoproliferação utilizando-se células dendríticas primadas:

Foram utilizadas placas de poliestireno (Costar, Cambridge, MA, USA) contendo 96 orifícios, onde foram adicionadas as DCs primadas com as antígenos de *C. albicans* e gp43 de *P. brasiliensis* na concentração de 1×10^6 céls/mL. Em seguida foram adicionados os linfócitos T autólogos, previamente selecionados negativamente e mantidos em cultura como descrito no item 4.1, na concentração de 2×10^6 céls/mL. O meio de cultura utilizado foi RPMI suplementado com gentamicina (40 µg/mL), glutamina (200 mM/mL), 2- Mercaptoetanol (5 µM/mL), 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal enriquecido com ferro (FCS), 1000 UI de IL-4 , 1000 UI de GM-CSF. A cultura foi mantida por 6 dias. Após 72 horas do início da cultura procedeu-se à coleta de sobrenadantes, para posterior análise da produção de IFN- γ pelo método imunoenzimático (ELISA). No quinto dia, 18 horas antes do término da cultura, foi adicionado 25 µL/orifício de Timidina triciada 0,5 µCi/orifício (Amersham, NEN). A proliferação de clones linfocitários específicos foi analisada pela medição radioativa no contador beta (1205 Betaplate Wallac).

12-Coleta de sobrenadantes dos ensaios de linfoproliferação após 72 horas de cultivo:

Para a análise da produção de citocinas nos ensaios de linfoproliferação, foram coletadas amostras de sobrenadantes 72 horas após o início da cultura celular para posterior dosagem de IFN- γ . As células que permaneceram sem estímulo compõem nosso controle basal.

13-Análise da produção de citocinas através do método imunoenzimático (ELISA):

Foram utilizadas placas de poliestireno (Costar, Cambridge, MA, USA) contendo 96 orifícios que foram previamente sensibilizados com anticorpos de captura (R&D, MN, USA) diluídos em PBS nas concentrações indicadas pelo fabricante. Em seguida, as placas foram seladas e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, foram lavadas com tampão de lavagem PBS 0,05% Tween 20 (Sigma, St.Louis, MO, USA) e foram bloqueadas com solução de bloqueio PBS 1% BSA (Sigma, St.Louis, MO, USA). Novamente foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora. Após nova lavagem, as amostras de sobrenadantes e a curva controle (R&D, USA, MN) foram pipetados em seus respectivos orifícios. A amostra da curva controle foi diluída a partir das concentrações: IL-10: 1000 pg/mL; IL-12: 2000 pg/mL; TNF- α : 1000 pg/mL. Amostras de pacientes e curvas controle foram analisadas em duplicata. Após nova incubação à temperatura ambiente por 2 horas o procedimento de lavagem foi executado e pipetou-se o anticorpo de detecção (R&D, USA, MN) diluído em tampão de bloqueio em concentração determinada pelo fabricante. Incubou-se à temperatura ambiente por 2 horas e após nova lavagem, adicionou-se estreptavidina diluída em solução de bloqueio seguida de nova incubação de 20 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem foi adicionado substrato tetrametilbenzidina - TMB (BioMérieux, Boxtel, NL). A incubação foi feita à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura espectrofotométrica foi feita na leitora de placas (Versamax Molecular Devices, USA) no comprimento de onda de 450 nm.

14. Análise estatística:

Os dados foram avaliados por ANOVA, através de comparações de duas condições experimentais, utilizando o teste não paramétrico de “Mann Whitney”. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $P < 0,05$.

A seguir, o **Quadro 2** expõe resumidamente todo o protocolo utilizado.

Quadro 2: Quadro simplificado das etapas metodológicas utilizadas. Após os sobrenadantes serem colhidos, foram congelados a -70°C para posterior realização das dosagens de citocinas pelo método ELISA.

| Etapas metodológicas | coleta | 3° | 6° | 7° | 8° | 13° |
|---|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Obtenção de PBMC | X | | | | | |
| Obtenção de monócitos | X | | | | | |
| Obtenção de linfócitos | X | | | | | |
| Análise fenotípica de monócitos | X | | | | | |
| Cultura de monócitos | X | | | | | |
| Cultura de linfócitos | X | | | | | |
| Fenótipo de diferenciação de monócitos em DC | | | | X | | |
| Troca do meio de cultura | | X | X | | | |
| Adição de antígenos | | | | X | | |
| Coleta de sobrenadantes de DCs estimuladas após 18h | | | | | X | |
| Análise fenotípica de moléculas co-estimulatórias | | | | | X | |
| Ensaio de fagocitose | | | | X | X | |
| Seleção negativa de linfócitos | | | | | X | |
| Ensaio de linfoproliferação | | | | | X | X |
| Coleta de sobrenadantes ensaios linfoproliferação 72h | | | | | | X |
| ELISA de sobrenadantes | | | | | | |

Resultados

Padronização da técnica de obtenção de monócitos de sangue periférico através de gradiente de densidade e cultivo de células dendríticas:

Inicialmente foi necessário padronizar o ensaio para obtenção de monócitos através de gradiente de densidade. A metodologia utilizada composta por dois gradientes de densidade foi considerada satisfatória, visto que o rendimento na obtenção de monócitos foi em média de 75%, utilizando-se marcação com anticorpos anti-CD14 para análise por citometria de fluxo. Foram realizados quatro ensaios com amostras de sangue de indivíduos saudáveis (controles) (**Figura 1**).

Após esta etapa, iniciamos o cultivo destes monócitos para diferenciação em células dendríticas (moDC). Foram cultivados monócitos de sete amostras de indivíduos saudáveis (controles) durante três diferentes tempos (7, 9 e 11 dias) para determinar o melhor período de diferenciação. As células foram analisadas quanto aos marcadores de superfície característicos de DCs, tais como CD11c, CD14, CD86 e HLA-DR através de citometria de fluxo. No cultivo por 11 dias observamos alta mortalidade celular (dados não mostrados). O cultivo em 7 dias demonstrou ser o ideal, visto que os receptores de superfície CD14 e CD11c mostraram significativa diferença (média \pm erro padrão: CD14 7º dia: $2,7 \pm 0,6$ vs 9º dia: $8,7 \pm 1,7\%$; CD11c 7º dia: $32,3 \pm 5,5\%$ vs 9º dia: $9,2 \pm 2,9\%$; $P < 0,01$), sendo este o fenótipo característico de DCs não estimuladas (**Figuras 2, 3, 4 e 5**).

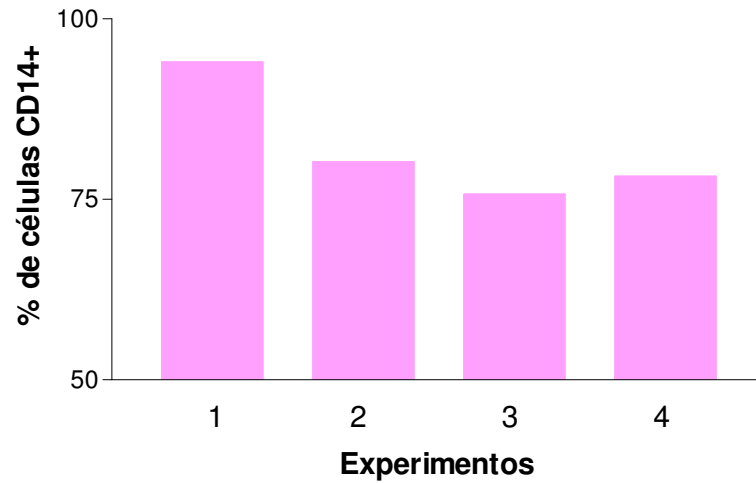


Figura 1: Obtenção de monócitos a partir de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles), utilizando-se a técnica de gradiente de densidade Ficoll-Hypaque / Percoll (n=4).

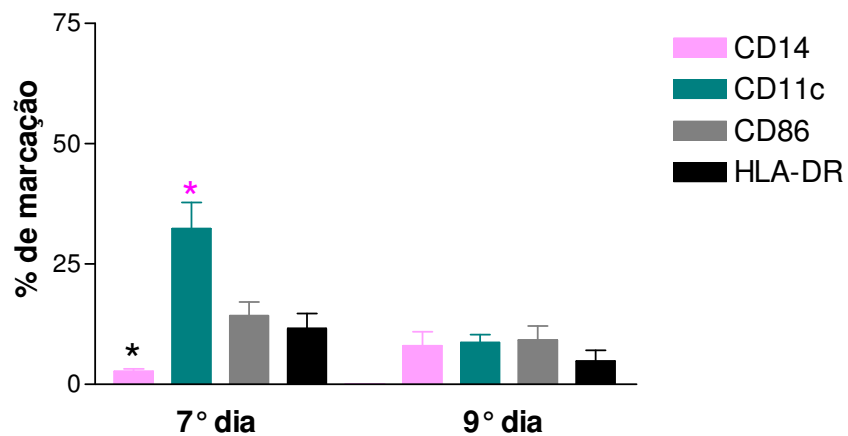


Figura 2: Porcentagem de expressão de marcadores de superfície após cultivo de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles) na presença de GM-CSF (1000 UI/mL) e IL-4 (1000 UI/mL) por 7 e 9 dias (** $P < 0,01$ vs 9° dia). Análise realizada por citometria de fluxo (n=7).

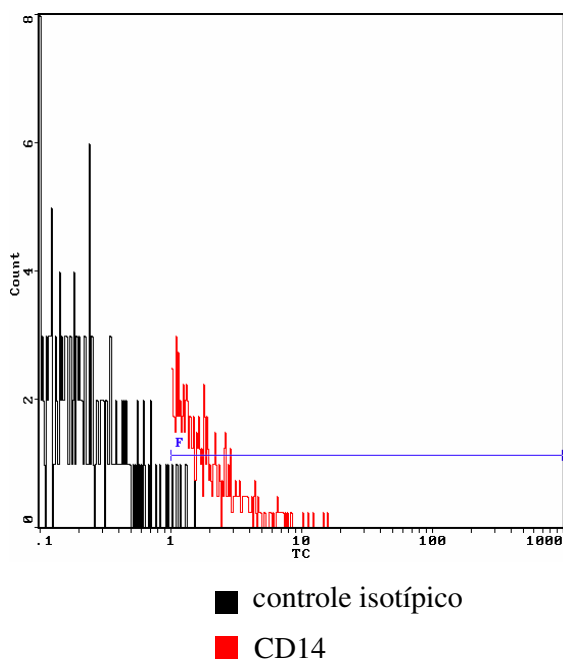


Figura 3: Análise por citometria de fluxo da expressão de CD14 após o cultivo de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles) na presença de GM-CSF (1000 UI/mL) e IL-4 (1000 UI/mL) por 7 dias. Resultado representativo dos experimentos realizados (n=7).

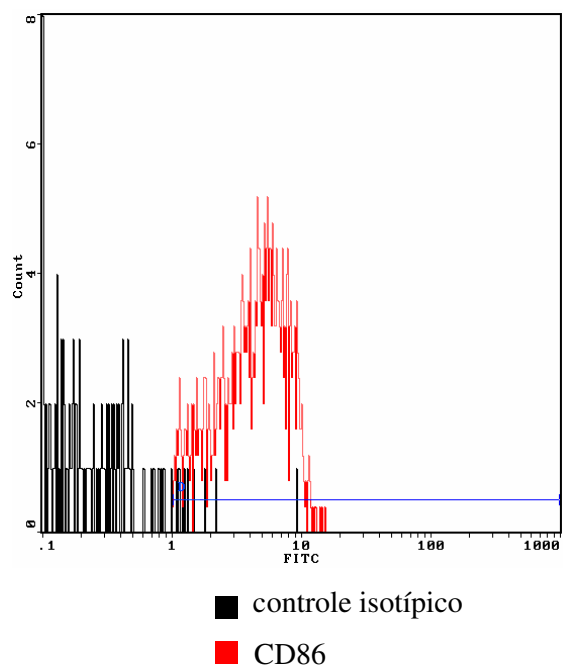


Figura 4: Análise por citometria de fluxo da expressão de CD86 após o cultivo de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles) na presença de GM-CSF (1000 UI/mL) e IL-4 (1000 UI/mL) por 7 dias. Resultado representativo dos experimentos realizados (n=7).

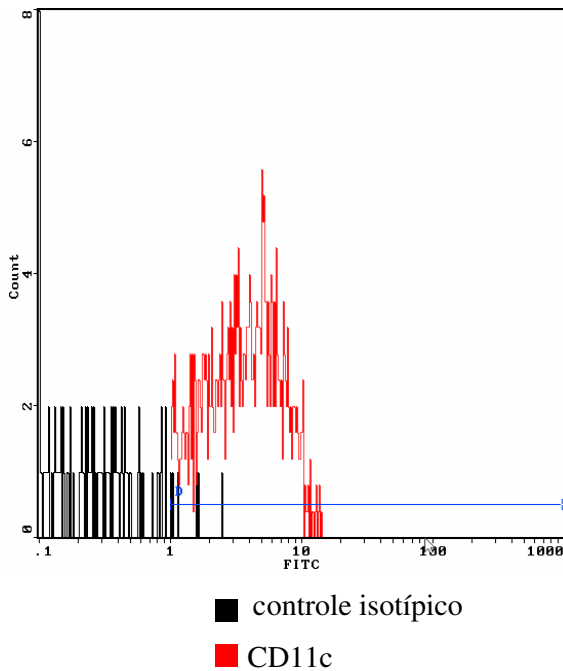


Figura 5: Análise por citometria de fluxo da expressão de CD11c após o cultivo de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles) na presença de GM-CSF (1000 UI/mL) e IL-4 (1000 UI/mL) por 7 dias. Resultado representativo dos experimentos realizados (n=7).

Análise morfológica de células dendríticas cultivadas por 7 dias :

Paralelamente à análise fenotípica, foi realizado estudo morfológico das células cultivadas a partir de amostras de indivíduos saudáveis (controles), utilizando-se microscopia óptica e coloração da lâmina com hematoxilina-eosina. Constatamos fenótipo característico do tipo celular estudado com núcleo bem desenvolvido, citoplasma hialino e projeções citoplasmáticas (**Figura 6**).

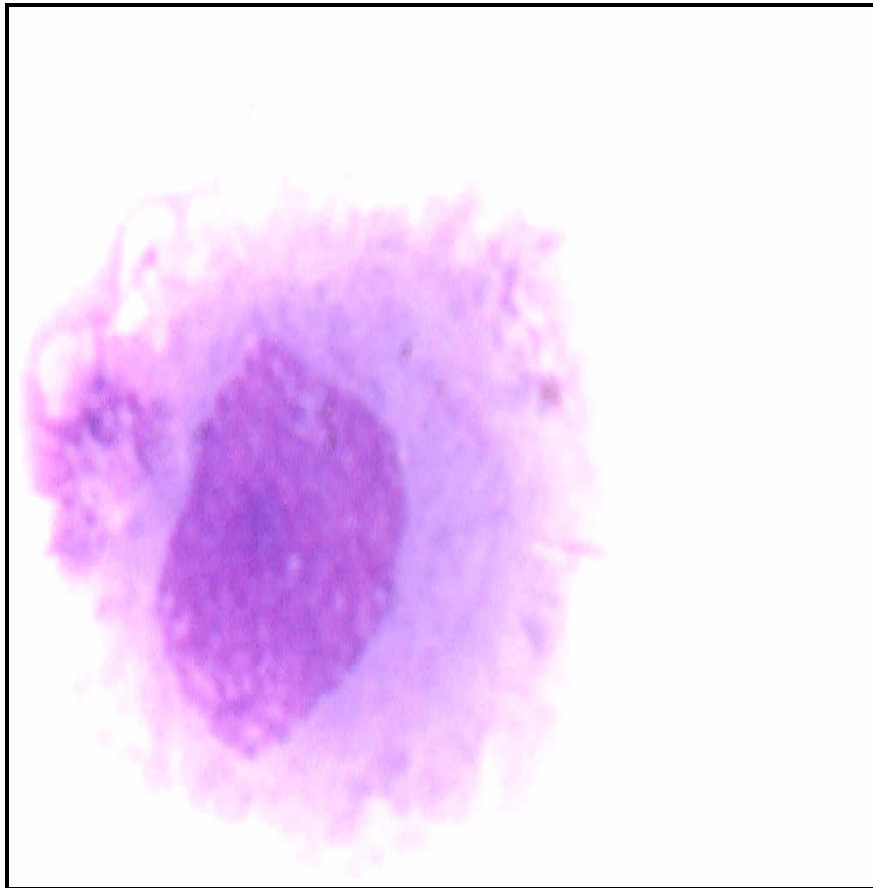


Figura 6: Microscopia óptica demonstrando a morfologia das moDCs após 7 dias de cultivo com GM-CSF e IL-4. Coloração: Hematoxilina-eosina, 100x.

Análise fenotípica comprobatória da diferenciação de monócitos em células dendríticas em amostras de pacientes com PCM:

Analizamos amostras de 12 pacientes, cujos monócitos foram mantidos em cultura por 7 dias em condições favoráveis para a diferenciação em DCs. Após esse período, a expressão dos marcadores de superfície foi analisada através de citometria de fluxo. As células apresentaram o padrão característico de DCs, expressando CD11c, CD86 e HLA-DR (**Figura 7**).

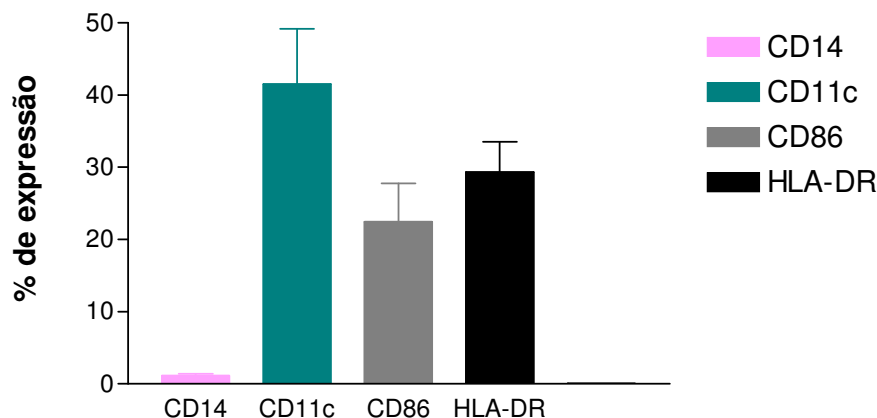


Figura 7: Porcentagem de expressão de marcadores de superfície de moDCs obtidas de amostras de sangue de pacientes com PCM, apresentando padrão fenotípico característico (n=12).

Ensaio de fagocitose utilizando-se gp43:

Para os ensaios de fagocitose avaliados através da técnica de citometria de fluxo, foram analisados cinco experimentos com indivíduos saudáveis (controles) e oito pacientes utilizando-se a gp43 como antígeno fúngico. Foi realizada padronização em diferentes períodos de tempo de incubação (1, 2, 24 e 48h). Foram demonstrados apenas os períodos de 1h e 24h de incubação, uma vez que o período de 2h se mostrou semelhante ao período de 1h. O ensaio de 48h apresentou grande quantidade de células mortas. Dextran foi usado como controle positivo.

Nos ensaios utilizando-se células de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com PCM ativa, observamos maior percentual de positividade (gp43 intracelular) no período de incubação com gp43 de 24 horas ($81,1\% \pm 4,1$ controles vs $66,9\% \pm 8,7$ pacientes) em relação ao período de incubação de 1 hora ($55,3\% \pm 13,7$ controles vs $34,9\% \pm 9,6$ pacientes) (**Figuras 8 e 9**).

A análise da capacidade fagocítica frente à gp43, comparando-se DCs de indivíduos saudáveis (controles) e DCs de pacientes, encontramos índices de

fagocitose inferiores no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (controles: 1 hora: 55,3 % \pm 13,7; 24 horas: 81,1 % \pm 4,1 vs pacientes 1 hora: 34,9 % \pm 9,6; 24 horas: 66,9 % \pm 8,7). Comparando-se a capacidade fagocítica no grupo de pacientes, com 24 horas de incubação a fagocitose é significativamente maior que a incubação com 1 hora (**Figura 10**).

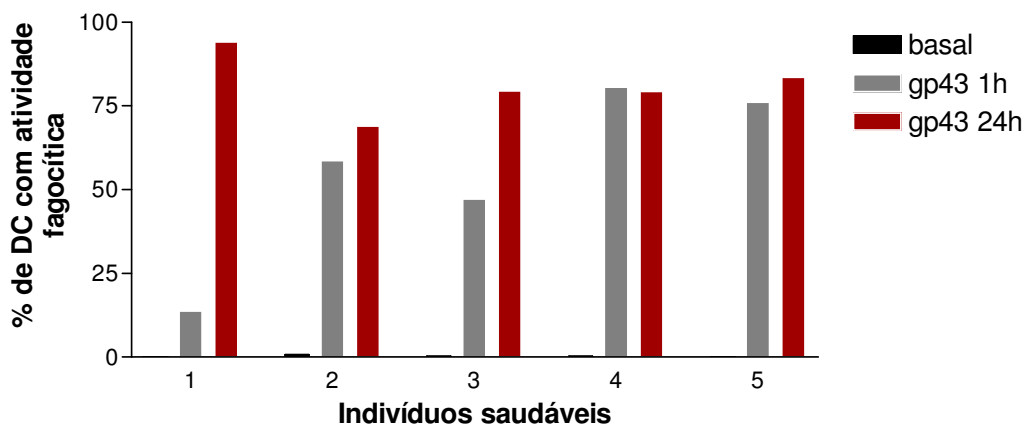


Figura 8: Ensaio de fagocitose utilizando-se células de indivíduos saudáveis (controles) e gp43 como antígeno (n=5).

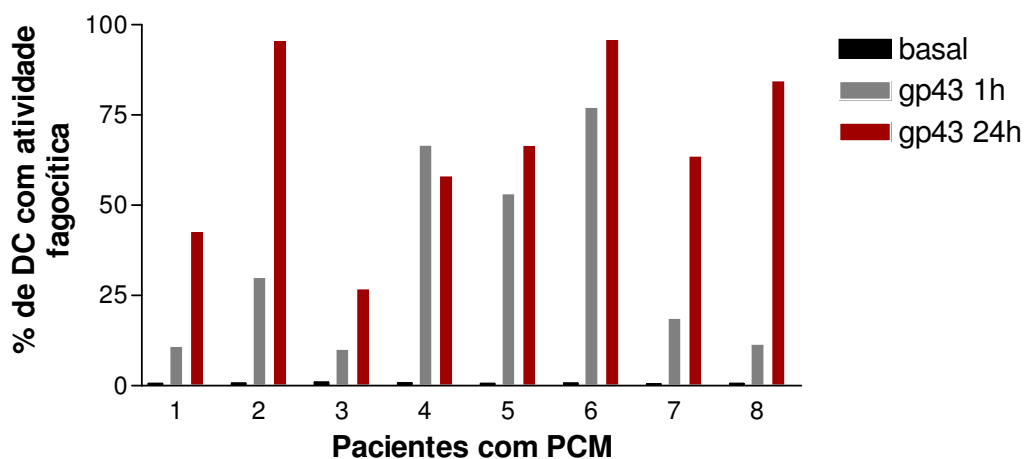


Figura 9: Ensaio de fagocitose utilizando-se células de pacientes com PCM e gp43 como antígeno (n=8).

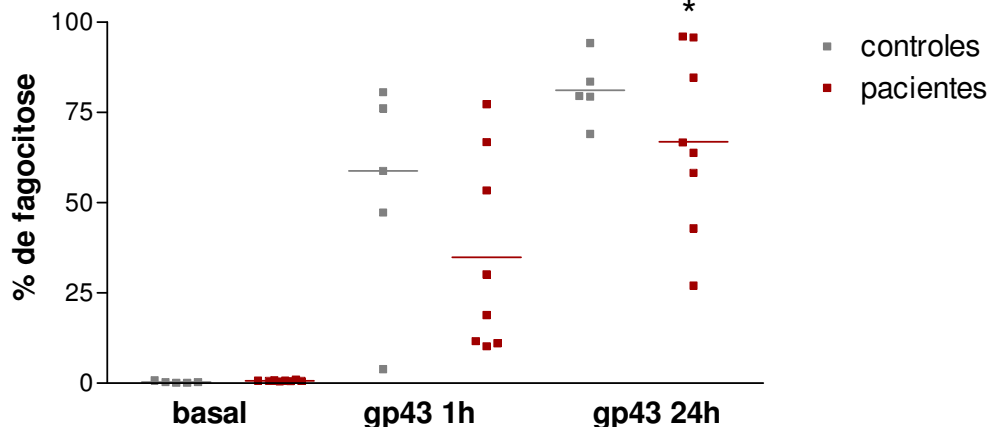


Figura 10: Ensaio de fagocitose utilizando-se gp 43 como antígeno, células de pacientes com PCM (n=8) e células dos indivíduos saudáveis (n=5). * $P < 0,05$ vs células de pacientes com 1 hora de incubação. Barras horizontais representam as médias.

Análise fenotípica de células dendríticas de pacientes e indivíduos saudáveis estimuladas com gp43 e CSA:

Nesta etapa, foram analisadas amostras de 12 indivíduos saudáveis (controles) e nove pacientes, utilizando-se a gp43 do *P. brasiliensis* e o antígeno somático da *C. albicans* (CSA) para estimulação celular. A expressão de CD14 manteve-se baixa em todas as situações de cultivo, confirmando que durante a estimulação antigênica não houve reversão da diferenciação (controles: basal $3,8 \pm 0,7$; CSA $2,2 \pm 0,3$ e gp43 $2,9 \pm 0,7$; pacientes: basal $1,9 \pm 0,7$; CSA $1,2 \pm 0,2$ e gp43 $2,0 \pm 0,7$). A análise da expressão de CD14 revelou índices significativamente maiores em DCs do grupo controle mantidas apenas com meio de cultura (basal) quando comparadas às células destes mesmos indivíduos estimuladas com CSA ($3,8 \pm 0,7$ vs $2,2 \pm 0,3$; $P < 0,05$). Esta diferença, não foi encontrada sob o estímulo com gp43.

A expressão de CD14 nas células de pacientes com PCM estimuladas com CSA também se mostrou menor em relação às células dendríticas do grupo controle sob o mesmo estímulo ($2,2 \pm 0,3$ vs $1,2 \pm 0,2$; $P < 0,05$). Analisando-se os mesmos grupos com o estímulo de gp43, não encontramos diferença (**Figura 11**).

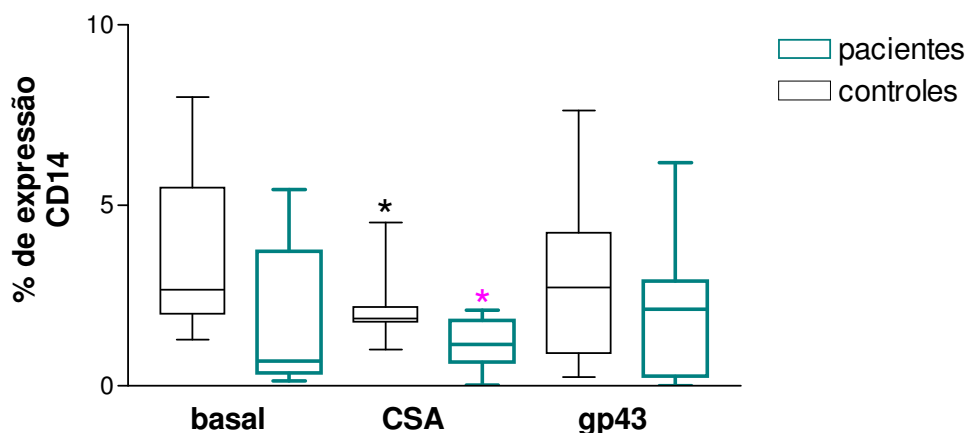


Figura 11: Porcentagem de expressão de CD14 em DCs mantidas em cultura na presença de meio (basal), estimuladas com antígeno somático de *C. albicans* (CSA) ou gp43 de *P. brasiliensis* (* $P < 0,05$ vs condição basal; * $P < 0,05$ vs controles com CSA). Barras horizontais representam as médias. Controles $n=12$, pacientes $n=9$.

Em relação à expressão de CD86 em DCs, quando analisamos o grupo de indivíduos saudáveis (controles) observamos índices significativos de expressão com o estímulo de CSA ($8,7 \pm 1,5$ vs $16,3 \pm 2,2$; $P < 0,05$) e gp43 ($8,7 \pm 1,5$ vs $21,4 \pm 3,0$; $P < 0,01$), quando comparados com a condição basal. No entanto, nas células de pacientes não observamos diferença significativa na expressão de CD86 com nenhum estímulo antigênico (basal: $17,2 \pm 4,0$; CSA: $23,3 \pm 5,2$ e gp43: $16,3 \pm 3,7$).

Analisando-se ainda a expressão desta molécula, observamos que entre as DCs de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes na condição basal, o grupo de pacientes apresentou maior expressão. Em contrapartida, em células do grupo controle e pacientes estimuladas com gp43 ocorre o inverso, sendo que os pacientes expressam menos CD86 em sua superfície que os controles (**Figura 12**).

Da mesma forma a expressão de HLA-DR nas DCs de indivíduos saudáveis (controles) também aumentou significativamente frente ao estímulo antigênico, quando comparada com a condição basal (CSA: $8,8 \pm 2,1$ vs $14,1 \pm 1,9$; gp43: $8,8 \pm 2,1$ vs $18,0 \pm 2,8$; $P < 0,05$). Já nas células de pacientes, observamos aumento

significativo da expressão desta molécula apenas sob estímulo de CSA ($15,7 \pm 4,1$ vs $29,0 \pm 5,4$; $P < 0,05$), comparando-se com a condição basal.

A comparação entre os grupos demonstrou aumento significativo na expressão de HLA-DR no grupo de DCs de pacientes estimuladas com CSA em relação as DCs de indivíduos saudáveis (controles) sob o mesmo estímulo ($14,1 \pm 1,9$ vs $29,0 \pm 5,4$; $P < 0,05$). Células de pacientes estimuladas com gp43 não apresentaram diferença na expressão deste receptor, quando comparadas com a condição basal (**Figura 13**).

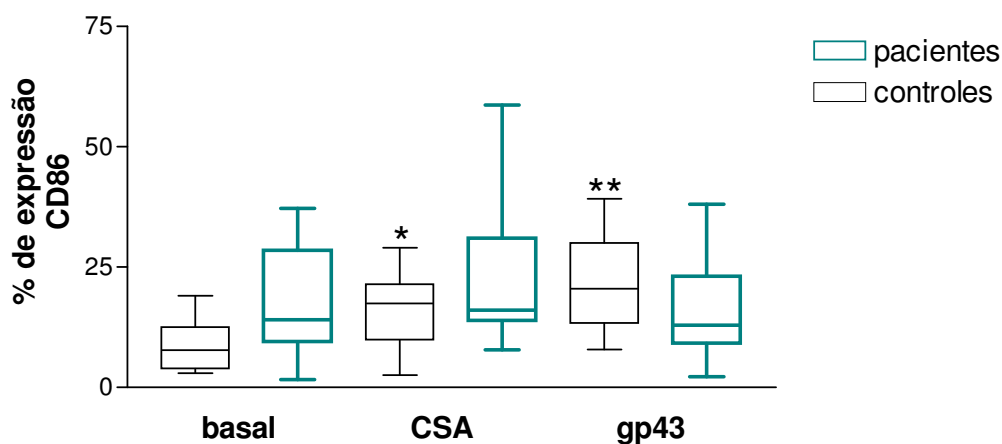


Figura 12: Porcentagem de expressão de CD86 em DCs mantidas em cultura na presença de meio (basal), estimuladas com antígeno somático de *C. albicans* (CSA) ou gp43 de *P. brasiliensis* (* $P < 0,05$ vs condição basal; ** $P < 0,01$ vs condição basal) Barras horizontais representam as médias. Controles $n=12$, pacientes $n=9$.

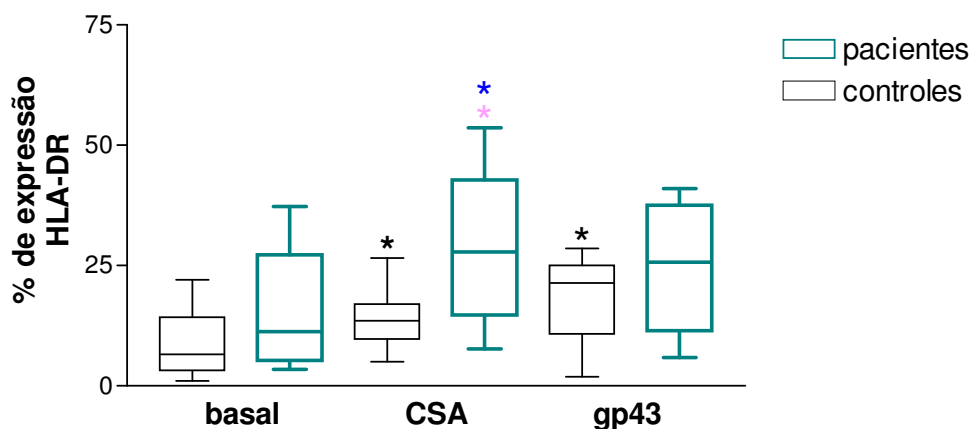


Figura 13: Porcentagem de expressão de HLA-DR em DCs mantidas em cultura na presença de meio (basal), estimuladas com antígeno somático de *C. albicans* (CSA) ou gp43 de *P. brasiliensis* (* $P < 0,05$ vs condição basal; ** $P < 0,05$ vs pacientes basal, * $P < 0,05$ vs controles com CSA). Barras horizontais representam as médias. Controles n=12, pacientes n=9.

Foi analisada ainda a expressão de CD11c por meio de citometria de fluxo. No grupo de indivíduos saudáveis (controles), pudemos observar aumento da expressão deste receptor sob o estímulo de gp43 quando comparado com a condição basal ($30,3 \pm 4,3$ vs $19,7 \pm 2,7$; $P < 0,05$). No entanto, as células destes indivíduos quando estimuladas frente a CSA não apresentaram aumento da expressão desta molécula.

Em relação às células de pacientes com PCM, pudemos observar expressão significativamente maior de CD11c nas condições de cultivo basal e CSA, quando comparadas com a expressão no grupo de indivíduos saudáveis (controles) (basal: $19,7 \pm 2,7$ vs $44,2 \pm 6,6$; $P < 0,01$; CSA: $44,5 \pm 6,4$ vs $20,5 \pm 2,9$; $P < 0,01$). A expressão da molécula em células estimuladas com gp43 não mostrou diferença significativa entre os grupos controle e paciente. O estímulo antigênico com CSA e gp43 não foi capaz de alterar de maneira significativa a expressão deste receptor nas DCs de indivíduos com a doença, comparados com a condição basal.

Adicionalmente, observamos uma tendência de redução da expressão de CD11c no grupo de pacientes sob estímulo de gp43, quando comparado com a condição

basal ($34,5 \pm 6,6$ vs $44,2 \pm 6,6$) mas não de maneira estatisticamente significativa (Figura 14).

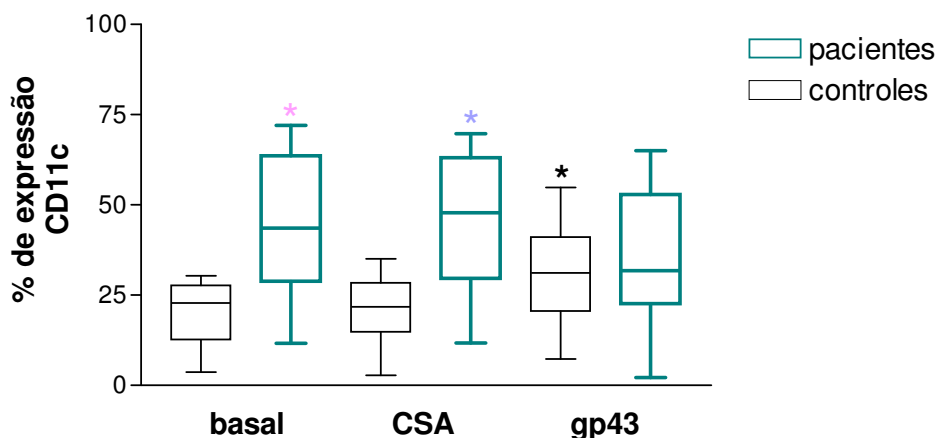


Figura 14: Porcentagem de expressão de CD11c em DCs mantidas em cultura na presença de meio (basal), estimuladas com antígeno somático de *C. albicans* (CSA) ou gp43 de *P. brasiliensis*. (* $P < 0,01$ vs controles basal; * $P < 0,01$ vs controles com CSA; * $P < 0,05$ vs controles basal). Barras horizontais representam as médias. Controles n=12, pacientes n=9.

Análise da produção de citocinas pelas células dendríticas de pacientes e indivíduos saudáveis (controles) empregando-se o método ELISA:

A proposta seguinte foi avaliar a produção de citocinas como TNF- α , IL-12 e IL-10 produzidas pelas DCs estimuladas com gp43 e com o CSA com o intuito de avaliar melhor o papel efetor destas células em cultivos *in vitro*.

A avaliação de IL-12 em sobrenadantes de cultura foi realizada empregando-se DCs obtidas de 10 indivíduos saudáveis (controles) e de nove pacientes com PCM ativa. A produção de IL-12 em DCs estimuladas com CSA ou ainda mantidas apenas com meio de cultura se mostrou semelhante entre os grupos controle e paciente.

Nas células do grupo de indivíduos saudáveis (controles), observamos níveis de produção de IL-12 semelhantes, mesmo sob estímulos antigênicos com CSA e gp43.

Já nas células de pacientes com PCM pudemos observar que o estímulo antigênico foi capaz de aumentar as médias de produção de IL-12 em relação à produção basal ($68,6 \pm 36$ vs $30,6 \pm 2,9$). Nas células mantidas com gp43 observamos ainda níveis de IL-12 significativamente maiores em relação ao estímulo com CSA ($102,5 \pm 17,3$ vs $30,3 \pm 2,9$; $P < 0,01$).

A comparação entre os grupos demonstrou média de produção de IL-12 duas vezes maior por DCs de pacientes estimuladas com gp43 quando comparada com o grupo de indivíduos saudáveis (controles) ($102,5 \pm 17,3$ vs $56,4 \pm 10$; $P < 0,05$) (**Figura 15**).

Em relação à produção de IL-10, não observamos diferenças significativas em nenhuma situação estudada (**Figura 16**).

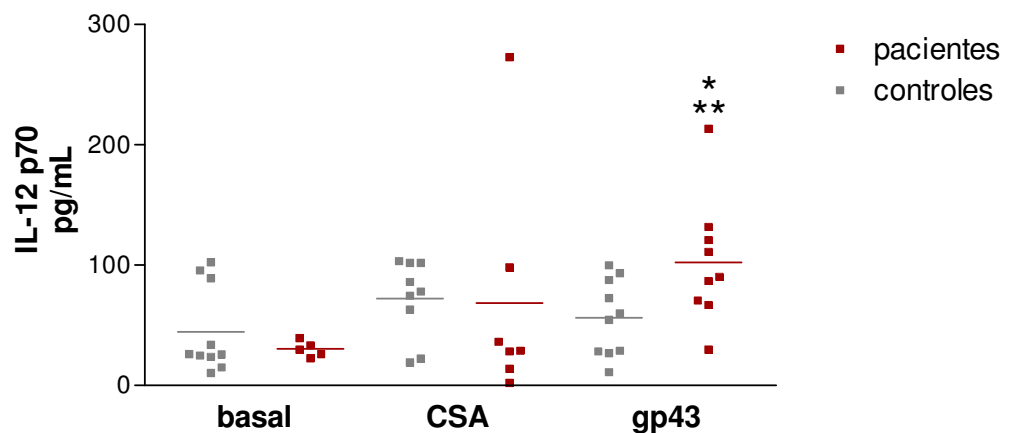


Figura 15: Dosagem da produção de IL-12 por DCs de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com PCM, mantidas em cultura na presença de meio (basal), estimuladas com antígeno de *C. albicans* (CSA) e gp43 do *P. brasiliensis* (* $P < 0,01$ vs condição basal, ** $P < 0,05$ vs controles com gp43). Barras horizontais representam as médias. Controles $n=10$, pacientes $n=9$.

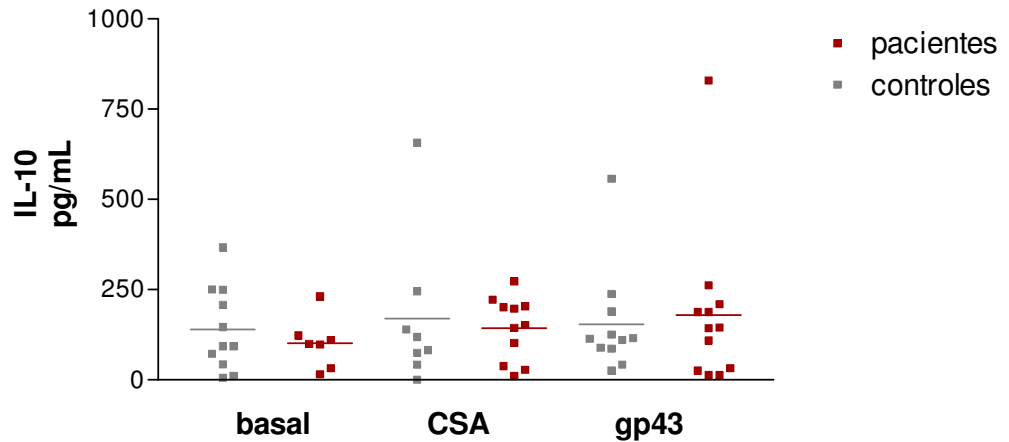


Figura 16: Dosagem da produção de IL-10 por DCs de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com PCM, mantidas em cultura na presença de meio (basal), estimuladas com antígeno de *C. albicans* (CSA) ou gp43 do *P. brasiliensis*. Barras horizontais representam as médias. Controles n=11, pacientes n=12.

Em relação a produção de TNF- α , foram estudados sobrenadantes de cultura de oito indivíduos saudáveis (controles) e 10 pacientes com PCM. A produção desta citocina foi semelhante no grupo de controles em todas as condições estudadas, com discreto aumento em células cultivadas na presença de gp43 (basal: $27,8 \pm 5,7$; CSA: $40,7 \pm 4,0$; gp43: $151,5 \pm 106,8$).

Em relação aos pacientes, pudemos observar maior produção de TNF- α em todas as condições de cultivo. No entanto, apenas após estímulo com gp43, encontramos produção significativa desta citocina, quando comparada com a condição basal ($442,4 \pm 210,1$ vs $57,9 \pm 7,6$; $P < 0,05$).

A comparação entre os grupos demonstrou uma produção de TNF- α sempre maior no grupo de pacientes. No entanto esta diferença se mostrou significativa apenas para a condição basal ($57,9 \pm 7,6$ vs $27,8 \pm 5,7$; $P < 0,05$) e para o estímulo com gp43, nas quais as células dos pacientes produziram cerca de 10 vezes mais TNF- α em relação às células dos indivíduos saudáveis (controles) ($442,4 \pm 210,1$ vs $40,7 \pm 3,9$; $P < 0,01$) (**Figura 17**).

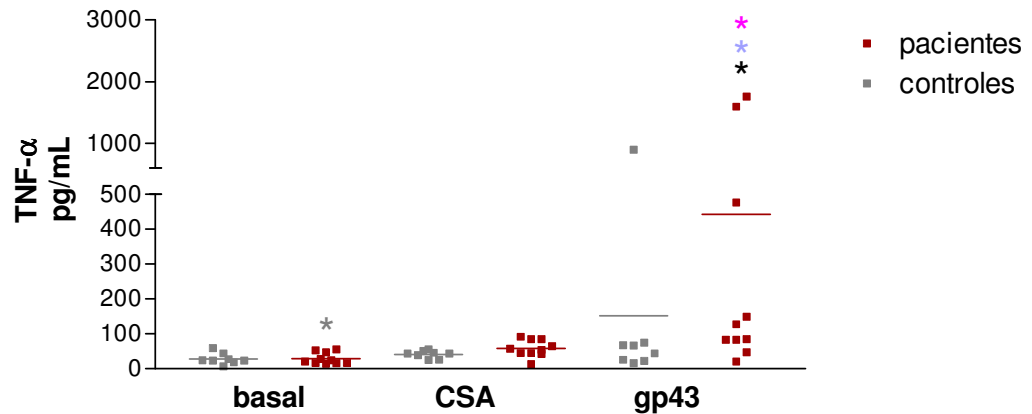


Figura 17: Dosagem da produção de TNF- α por DCs de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com PCM, mantidas em cultura na presença de meio (basal) e estimuladas com antígeno de *C. albicans* (CSA) ou gp43 do *P. brasiliensis*. (* $P < 0,05$ vs basal controles; * $P < 0,05$ vs basal pacientes; * $P < 0,05$ vs pacientes com CSA; * $P < 0,01$ vs controle com gp43). Barras horizontais representam as médias. Controles n=8, pacientes n=10.

Ensaio de linfoproliferação e avaliação da produção de citocinas de linfócitos estimulados por células dendríticas primadas com gp43 e CSA:

A avaliação da produção de citocinas e da resposta proliferativa de linfócitos mantidos em cultura com DCs primadas com os antígenos gp43 e CSA foi realizada em cinco pacientes com PCM. Nestes dados, não observamos alteração significativa da resposta linfoproliferativa frente à gp43, em relação a achados anteriores de cultura de células mononucleares (Benard *et al.*, 1997, 2001; Romano *et al.*, 2002) e houve apenas um discreto aumento na produção de IFN- γ por esses linfócitos (**Quadro 3**).

Quadro 3: Detecção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células de quatro indivíduos saudáveis (controles) e cinco pacientes com PCM. A resposta linfoproliferativa foi demonstrada nas médias das triplicatas (Δ cpm) na situação basal (meio de cultura), estímulo de gp43 e estímulo de CSA em linfócitos autólogos cultivados com DCs primadas com antígenos ou mantidas apenas com meio por 6 dias.

| | dosagem de IFN- γ em sobrenadantes de cultura | | | proliferação de linfócitos | | |
|------------|--|------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| | IFN γ pg/mL basal | IFN γ pg/mL CSA | IFN γ pg/mL gp43 | Δ com basal | Δ com CSA | Δ com gp43 |
| controle 1 | 20,4 | 45,0 | 31,0 | | | |
| controle 2 | 73,7 | 79,0 | 81,0 | | | |
| controle 3 | 32,0 | 35,0 | 33,5 | | | |
| controle 4 | 21,2 | 43,2 | 38,5 | | | |
| paciente 1 | 30,0 | 48,0 | 39,0 | 319,0 | 23617,2 | 1918,0 |
| paciente 2 | 22,0 | 20,0 | 26,0 | 227,7 | 16600,6 | 1081,0 |
| paciente 3 | 21,0 | 63,0 | 48,0 | 678,6 | 7503,0 | 621,6 |
| paciente 4 | | | | 655,4 | 2605,3 | 1370,5 |
| paciente 5 | | | | 654,4 | 1081,1 | 113,3 |

Discussão

Nosso desafio inicial foi utilizar um volume reduzido de sangue dos pacientes para obtenção de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico. Modelos de obtenção e enriquecimento de monócitos estão descritos na literatura utilizando a técnica de separação por aderência (d'Ostiani *et al.*, 2000; Romani *et al.*, 1994), que se mostrou inadequada pelo baixo rendimento e intensa morte celular.

A técnica proposta por Almeida *et al.* (2000), Repnik *et al.* (2003) e Lehner *et al.* (2005) e modificada pelo nosso grupo, utilizando 2 gradientes de densidade se mostrou mais adequada, com enriquecimento da população de monócitos sem alteração de suas moléculas de superfície e ativação celular.

O tempo de cultivo dos monócitos também foi uma variável importante para o sucesso de nosso estudo. Nossos resultados demonstraram que o cultivo de monócitos por 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF foi suficiente para induzir a diferenciação em células dendríticas imaturas, com fenótipo e morfologia característica deste tipo celular. Este padrão fenotípico se caracteriza pela baixa expressão de CD14 (receptor do complexo lipopolissacarídeo característico de monócitos, macrófagos e neutrófilos) e expressão constitutiva de HLA-DR, CD86 (moléculas co-estimulatórias) e CD11c (integrina ligante de complemento) (Olweus *et al.*, 1997; Allavena *et al.*, 1998; McBride *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2002).

Vários autores também trabalham com um período de diferenciação de 7 dias. Porém, após obterem células dendríticas imaturas, utilizam citocinas recombinantes e mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, para maturação celular (Romani *et al.*, 1994; Anton *et al.*, 1998; Allavena *et al.*, 1998; Ebner *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2002; Dauer *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003; Lehner *et al.*, 2005). Esta etapa não foi utilizada em nosso estudo, uma vez que um

dos objetivos do trabalho foi verificar se a presença da gp43 de *P. brasiliensis* poderia promover isoladamente a maturação da célula dendrítica.

Após a etapa de obtenção dos monócitos e cultivo das células dendríticas, iniciamos a análise do papel das DCs na imunidade celular dirigida ao *P. brasiliensis*. Na PCM humana não existiam relatos de estudos utilizando células dendríticas derivadas de monócitos, e tampouco descrições sobre o papel desta célula na resposta imune celular de pacientes com a doença. Apenas um estudo realizado por Pagliari *et al.* (2002) que trabalhando com lesões da pele na PCM humana, sugerem a participação de dendrócitos dérmicos (DD) Fator XIIIa+ na formação de granulomas, produção de citocinas, bem como na apresentação dos antígenos aos linfócitos T.

Inicialmente, investigamos se células dendríticas derivadas de monócitos (moDC) poderiam reconhecer e fagocitar a gp43 de *P. brasiliensis*. Foram selecionados os ensaios de fagocitose nos períodos de 1 h e 24 h como referência, uma vez que os ensaios de 2h mostraram um padrão de fagocitose idêntico ao período de 1h e os ensaios com 48h apresentaram intensa morte celular.

A fagocitose da gp43 por células dendríticas de indivíduos saudáveis foi sempre maior que o percentual de fagocitose observado pelas DCs de pacientes com PCM. Esses dados corroboram achados anteriores de aspergilose, criptococose e candidíase, demonstrando um possível mecanismo de disfunção imune que poderia contribuir para permanência da infecção e doenças crônicas, com predomínio de produção de anticorpos durante o curso da doença e diminuição da resposta imune celular, com prevalência da resposta do tipo Th-2 (Persat *et al.*, 2003; Pietrella *et al.*, 2006; Wozniak *et al.*, 2006).

Estes resultados também reforçam achados anteriores de Giannini *et al.* (1990), Vicentini *et al.* (1994) e Sano *et al.* (1997), que apresentam a gp43 como sendo uma glicoproteína fúngica responsável pela penetração do *P. brasiliensis* no organismo e a instalação da doença, podendo assim estar envolvida na depleção da atividade de

células fagocíticas, responsáveis pela imunidade inata e conseqüentemente pela proteção do organismo frente ao fungo.

Paralelamente aos ensaios de fagocitose, realizamos a análise da expressão dos receptores de superfície e moléculas co-estimulatórias. Vários estudos têm correlacionado a expressão de moléculas de superfície com a ativação de DCs e conseqüentemente sua maturação após interagirem com antígenos. Em modelos de leishmaniose, Amprey *et al.* (2004) demonstraram que este protozoário pode inibir a ativação de células dendríticas humanas, possivelmente pela menor expressão de CD1, sugerindo um possível mecanismo de escape do patógeno em relação à resposta imune.

Em nosso trabalho investigamos a expressão de CD14, uma molécula que se apresenta com alta expressão em macrófagos e baixa expressão em células dendríticas. Observamos em nossa casuística que nas células dendríticas de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis, o padrão encontrado corrobora com os achados da literatura, confirmando a diferenciação deste tipo celular e mantendo-se assim durante todos os períodos da cultura.

Em relação a moléculas co-estimulatórias, a expressão de CD86 no grupo de indivíduos saudáveis foi modulada positivamente após estímulo antigênico, tanto na presença de CSA como frente gp43, demonstrando ativação das DCs. Quando analisamos as células de pacientes, observamos expressão constitutiva desta molécula. Porém, frente ao estímulo antigênico, estas células apresentam diminuição na expressão deste receptor, principalmente frente à gp43.

Em modelos humanos de PCM não existem descrições da expressão de moléculas co-estimulatórias em DCs. Mamoni *et al.* (2006) estudaram recentemente a expressão de CD86 em monócitos de pacientes e observaram maior expressão deste receptor em células de pacientes quando comparadas com indivíduos sensibilizados. Porém, a resposta analisada neste estudo foi inespecífica, utilizando mitógenos e *phorbol* (PMA) e ionomicina (Cacere *et al.*, 2002).

Resultados semelhantes aos nossos foram descritos por Kanto *et al.* (1999) utilizando células dendríticas de pacientes com hepatite C e indivíduos normais desafiadas com antígenos do *core* do vírus. Estes autores demonstraram menor expressão de CD86 em DCs de pacientes quando comparado ao grupo controle e o impacto desta menor ativação na capacidade linfoproliferativa através da interação das DCs primadas com linfócitos.

A expressão de CD86 é fundamental para a maturação da célula dendrítica e posteriormente apresentação de antígenos para linfócitos T no sítio da infecção. A interação CD86/CD28 determina o segundo sinal para ativação de linfócitos e o direcionamento para uma resposta imune específica (Janeway *et al.*, 2002). Neste estudo fica claro que as células dendríticas de pacientes após interagirem com o fungo apresentam uma regulação negativa do receptor CD86, comprometendo a ativação desta célula e possivelmente sua interação com os linfócitos T, o que poderia contribuir de maneira importante com a supressão da resposta imune celular dirigida ao patógeno.

Analisamos ainda a expressão de HLA-DR, fundamental para apresentação antigênica e ativação da DCs. No grupo de indivíduos saudáveis, a expressão de HLA-DR foi modulada positivamente pela presença do antígeno de *C. albicans* e da mesma forma pela gp43. Nas DCs de pacientes, a expressão de HLA-DR foi aumentada apenas com o estímulo de CSA.

Outros estudos em doenças infecciosas envolvendo patógenos como *Mycobacterium* e *Leishmania* também demonstraram diminuição da maturação da célula dendrítica através da regulação negativa de receptores HLA-DR e CD86 e ainda modificação da cinética de produção de citocinas que favorecem a ativação e o processo de fagocitose por estas células (Luft *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2002).

Na PCM, nossos dados demonstraram que as células de indivíduos saudáveis, após a fagocitose do fungo, são capazes de apresentar antígenos e conseqüentemente exercer seu efeito na resposta imune específica. Porém, as células de pacientes com

PCM apresentam deficiência nesta apresentação, com expressão reduzida de CD86 de maneira antígeno específica. Resultados semelhantes aos nossos foram descritos em modelos experimentais de PCM. Esses autores observaram menor ativação das células dendríticas de camundongos resistentes a PCM estimulados com gp43 através da baixa expressão de CD86 (Almeida *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004). Desta forma, a gp43 parece influenciar negativamente na expressão de receptores essenciais para a interação da célula com o patógeno, bem como em sua função de apresentação antigênica e favorecimento na instalação de uma resposta imune efetiva frente ao fungo.

Além disso, a resposta imune celular envolve uma série de moléculas de superfície que permitem a interação celular com o patógeno, ou ainda o reconhecimento do antígeno para posterior interação célula apresentadora-linfócito T.

Os receptores da família das integrinas presentes em células dendríticas derivadas de monócitos, como por exemplo CD11c, também podem reconhecer glicoproteínas de patógenos e colaborar para o processo de maturação da célula e conseqüentemente sua ativação (Prina *et al.*, 2003). A expressão de CD11c em células de indivíduos saudáveis foi modulada positivamente quando estimuladas com gp43. As DCs de pacientes apresentam expressão constitutivamente maior deste receptor, comparado ao grupo de indivíduos saudáveis. No entanto, o estímulo com antígeno de *C.albicans* não foi capaz de aumentar essa expressão, e sob estímulo de gp43 observamos discreta diminuição da expressão desta integrina.

Desta forma, nossos dados demonstraram uma menor ativação das células dendríticas de pacientes com PCM quando comparadas com indivíduos saudáveis. Essa menor ativação foi identificada principalmente pela baixa porcentagem expressão de moléculas co-estimulatórias como CD86 e HLA-DR. A expressão de CD11c também apresentou-se reduzida quando as células são estimuladas com a gp43, comparadas com a condição basal.

A proposta seguinte foi avaliar melhor a capacidade efetora destas células através da dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura. Após cultivo das DCs com meio ou estímulo de CSA e gp43, foram determinadas as concentrações de TNF- α , IL-10 e IL-12. Foi analisada ainda a produção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de DCs primadas com gp43 e cultivadas com linfócitos de pacientes com PCM. A média de produção de TNF- α foi sempre maior no grupo de pacientes com PCM quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. Além disso, DCs de pacientes estimuladas com gp43 produziram níveis significativamente maiores desta citocina em relação à condição basal do mesmo grupo. A produção de IL-12 mostrou-se semelhante entre DCs de indivíduos saudáveis e pacientes na condição basal de cultivo e sob estímulo de CSA. No entanto, o estímulo de gp43 foi capaz de aumentar de maneira significativa a produção desta citocina apenas em DCs de pacientes com PCM.

Paralelamente, não observamos diferença na produção de IL-10 por DCs e IFN- γ por linfócitos em nenhuma condição estudada.

Gafa *et al.* (2006) demonstraram que células dendríticas de indivíduos saudáveis em contato com *Aspergillus fumigatus* foram capazes de fagocitar o patógeno e também produzem TNF- α e IL-12, porém estas citocinas promoveram a maturação das DCs e sua ativação.

Ferreira *et al.* (2004) apresentaram resultados conflitantes em relação à produção de citocinas na PCM experimental. Estudos destes autores demonstraram menor ativação de DCs de camundongos resistentes a PCM estimulados com gp43 através da baixa produção de IL-12 e TNF- α . Porém, mais recentemente, este mesmo grupo estudou a modulação na resposta imune celular em camundongos susceptíveis a PCM imunizados com células dendríticas pulsadas com gp43. Os autores observaram baixa expressão de moléculas co-estimulatórias nas DCs e produção de IL-12 associada a um aumento da resposta inflamatória pulmonar e granulomas desorganizados (Ferreira & Almeida, 2006). Estes dados sugerem que nos animais susceptíveis, assim como observado em nossos pacientes, a ativação das DCs não

ocorre de maneira eficiente, mas existe produção de citocinas que colaboram para a resposta inflamatória. Paralelamente, nos animais resistentes, esta resposta é mais controlada, com níveis reduzidos de citocinas inflamatórias e ativação adequada das DCs, semelhante aos nossos dados em indivíduos saudáveis.

Na PCM humana, Parise-Fortes *et al.* (2006) demonstraram altos níveis de TNF- α e baixos níveis de IL-10 em lesões mucocutâneas de pacientes com a doença ativa analisadas por imunohistoquímica, que foram relacionadas à intensa atividade inflamatória. Tais níveis foram revertidos com o tratamento com anti-fúngicos.

Calvi *et al.* (2003) trabalhando com monócitos de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis, demonstraram que a eficiência na função fagocítica e microbicida depende da produção de TNF- α e IFN- γ .

Em modelos humanos de PCM outros estudos demonstraram anteriormente a existência de uma supressão da resposta imune celular em pacientes com a doença relacionada com: baixa resposta proliferativa de linfócitos frente ao fungo (Benard, *et al.*, 1997, 2001; Oliveira *et al.*, 2002), menor atividade fungicida de macrófagos, alta produção de IL-10 associada a baixos níveis de IL-12 e IFN- γ (Karhawi *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2002; Peraçoli *et al.*, 2003) nos estudos *in vitro* com gp43, apoptose de linfócitos induzida pela gp43 (Cacere *et al.*, 2002) e menor expressão de receptores para IL-12 nos linfócitos (Romano *et al.*, 2005).

Entretanto, nossos dados neste estudo demonstraram que na PCM humana o mecanismo de susceptibilidade imunológica para a doença envolve também a inibição da maturação e da capacidade fagocítica das células dendríticas, possivelmente pela regulação negativa de CD11c, CD86 e HLA-DR, de maneira antígeno específica, comprometendo o mecanismo inicial da imunidade adaptativa.

Além disso, apesar do número reduzido de pacientes (n=5) nos ensaios de linfoproliferação, observamos que a interação DC-linfócitos nos pacientes com PCM pareceu comprometida. Ao analisarmos os resultados obtidos com o antígeno fúngico

de *C. albicans* usado como controle, constatamos a presença de resposta linfoproliferativa, mas não houve alteração na produção de IFN- γ , que permaneceu baixa em todas as situações estudadas.

Por outro lado, as células dendríticas de pacientes em contato com a gp43 produzem altos níveis de TNF- α e IL-12 que poderiam contribuir para atividade inflamatória e para imunidade inata.

Conclusões

Os resultados aqui demonstrados permitem concluir que:

- O protocolo de padronização de obtenção de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico se mostrou eficiente, com enriquecimento da população de interesse e utilização de baixo volume de amostra.
- Células dendríticas de indivíduos saudáveis (controles) não sensibilizados ao *P. brasiliensis*, em contato com a gp43 fagocitam este antígeno e sofrem ativação, expressando moléculas co-estimulatórias e integrinas.
- Células dendríticas de pacientes com PCM em contato com a gp43, apresentam déficit na capacidade fagocítica e na apresentação antigênica, alteração esta que não foi verificada frente o antígeno somático de *C.albicans* (CSA), usado como controle.
- As células dendríticas de pacientes com PCM contribuem para intensa atividade inflamatória observada na doença ativa, possivelmente pela produção de grandes quantidades de TNF α e IL-12.

Referências Bibliográficas

Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol.* 1998; 28(1): 359-69.

de Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(2): 221-3.

de Almeida SR, de Moraes JZ, de Camargo ZP, Gesztesi JL, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 1998; 190(1): 68-76.

Almeida SR, Lopes JD. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(4): 529-37.

Amprey JL, Spath GF, Porcelli AS. Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 2004; 72(1): 589-92.

Anton D, Dabadghao K, Palucka K, Holm G, Yi Q. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scand J Immunol.* 1998; 47(2): 116-21.

Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med.* 1996; 128(6): 594-600.

Baida H, Biselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1999; 1(4): 273-8.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392(6673): 245-52.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 767-811.

Beaman L. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on *in vitro* interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 1991; 59(11): 4227-9.

Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in Paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis.* 1997; 175(5): 1263-7.

Benard G, Duarte, AJ. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(4): 1032-9.

Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human Paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001; 13(4): 248-52.

Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with the clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(3): 671-6.

Bozza S, Gaziano R, Lipford GB, Montagnoli C, Bacci A, Di Francesco P, Kurup VP, Wagner H, Romani L. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect.* 2002; 4(13): 1281–90.

Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, Di Francesco P, Romani L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol.* 2002; 168(3): 1362-71.

Cacere CR, Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol.* 2002; 105(2): 215-22.

Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol.* 1985; 66(5): 585-94.

Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(5): 615-23.

Calvi SA, Peracoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AM. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003; 5(2): 107-13.

Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free-antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol.* 1991;9(1): 31-8.

Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among

progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun.* 1995; 63(5): 1777-83.

Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Burger E, Calich VL. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *Infect Immun.* 1998; 66(2): 800-6.

Cao X, Sugita M, Van Der Wel N, Lai J, Rogers RA, Peters PJ, Brenner MB. CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2002; 169(9): 4770-7.

Carbonell LM, Pollak L. Ultrastructure of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures of the yeast-like phase. *Mycopathol Mycol Appl.* 1963 15;19: 184-204.

Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem.* 1996; 271(8): 4553-60.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. *Paracoccidioidomycosis* mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica.* 2002; 18(5):1441-54.

Cunha DA, Zancoppe-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izaac, SM, Deepe GS, Soares CM. Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(2): 374-7.

Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol.* 2003; 170(8): 4069-76.

Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, De Franco MF. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia*. 1982; 77(1): 3-11.

Ebner S, Ratzinger G, Krösbacher B, Schmuth M, Weiss A, Reider D, Kroczeck RA, Herold M, Heufler C, Fritsch P, Romani N. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol*. 2001; 166(1): 633-41.

Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett*. 2004; 94(1-2): 107-14.

Ferreira KS, Almeida SR. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Immunol Lett*. 2006; 103(2): 121-6.

Ferreira MS, Freitas LH, Lacaz Cda S, del Negro GM, de Melo NT, Garcia NM, de Assis CM, Salebian A, Heins-Vaccari EM. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J Med Vet Mycol*. 1990;28(3):253-6.

Flavia Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*. 2002; 218(1-2): 87-94.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987; 20(2): 129-32.

Gafa V, Lande R, Gagliardi MC, Severa M, Giacomini E, Remoli ME, Nisini R, Ramoni C, Di Francesco P, Aldebert D, Grillot R, Coccia EM. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a

differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun.* 2006; 74(3): 1480-9.

Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM, Masuda A, Amato Neto V, Ferreira AW. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43(2): 200-6.

Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L, Rajnavolgyi E. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR gamma. *Blood.* 2007 15; 109(2):643-52. Epub 2006

Gomez BL, Fogueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobon AM, Hay RJ, Restrepo A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87 kilodaltons determinant during and after antifungal therapy. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(11): 3309-16.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer M, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1990; 145(12):4290-7.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL-3) and CD-40 ligant. *J Exp Med.* 1997; 185(6): 1101-11.

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun.* 2002; 70(9): 5167-76.

Hsu TL, Chang YC, Chen SJ, Liu YJ, Chiu AW, Chio CC, Chen L, Hsieh SL. Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3. *J Immunol.* 2002; 168(10): 4846-53.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology* 5th ed. New York and London: Garland Science; 2001

Juvenale M, Del-Negro GM, Duarte AJ, Benard G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2001; 50(2): 127-34.

Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 1999; 20(12): 561-7.

Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus infected individuals. *J. Immunol.* 1999; 162(9): 5584-91.

Karhawi AS, Colombo AL, Salomão R. Production of IFN γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol.* 2000; 38(3): 225-29.

Lacaz CS, Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. P 1-12. CRC Press, 1993.

Langermans JA, van der Hulst ME, Nibbering PH, van Furth R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma-interferon-treated mice. *Infect Immun.* 1992; 60(12): 5107-12.

Lehner M, Morhart P, Stilper A, Holter W. Functional characterization of monocyte-derived dendritic cells generated under serumfree culture conditions. *Immunol Lett.* 2005; 99(22): 209-16.

Londero AT, Melo IS. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia.* 1983; 82(1): 49-55.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.

Luft T, Luetjens P, Hotchrein H, Toy T, Masterman KA, Rizkalla M, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. IFN-alpha enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol.* 2002; 14(4):367-80.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cells subsets. *Blood.* 2002; 100(13): 4512-20.

Maldonado- Lopez R, De Smedt T, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Maliszewski CR, Moser M. Role of CD8 alpha + and CD8 alpha - dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(2): 242-6.

Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2006; 35(3-4): 207-16.

Matsiota-Bernard P, Lefebvre M, Sedqui M, Cornillet M, Guenounou M. Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *Infect Immun.* 1993; 61(12): 4980-3.

McBride JM, Jung T, De Vries JE, Aversa G. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* 2002; 215(2): 162-72.

McEwen JG, Ortiz BL, Garcia AM, Florez AM., Botero S, Restrepo A. Molecular cloning, nucleotide sequencing and characterization of the 27 kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 1996; 20(2): 125-131.

Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000 – molecular weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(12): 2842-5.

Mendes-Giannini MJ, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco, M.; Lacaz CS., Restrepo-Moreno A, Del-Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton. Florida. EUA: 1994.

Miller MA, Skeen MJ, Ziegler HK. Nonviable bacterial antigens administered with IL-12 generate antigen-specific T cell responses and protective immunity against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 1995; 155(10): 4817-28.

Moll H. Dendritic cells as a tool to combat infections disease. *Immunol Lett.* 2003; 85(2): 153-7.

Montenegro MR. Clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop.* 28: 203-204, 1986

Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, Budd R, O'Garra A, Fong TA, Bond MW, Moore KW, Sher A, Fiorentino DF. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol Rev.* 1991; 123: 209-29.

Newman SL, Holly A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun.* 2001; 69(11): 6813-22.

Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Klüter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2003; 275(1-2): 57-68.

Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002; 4(2):139-44.

Olweus J, Bitmansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cells ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(23): 12551-6.

d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 2000; 191(10): 1661-74.

Pagliari C, Sotto MN. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. *Med Mycol*. 2002; 40(4): 407-10.

Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol*. 2003; 25(2): 107-12.

Paniago AM, Freitas AC, Aguiar ES, Aguiar JI, Cunha RV, Castro AR, Wanke, B. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. *J Infec*. 2005; 51(3): 248-52.

Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous

lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol.* 2006; 154(4): 643-50.

Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC., Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003; 5(5): 413-8.

Persat F, Noirey N, Diana J, Gariazzo MJ, Schmitt D, Picot S, Vincent C. Binding of live conidia of *Aspergillus fumigatus* activates in vitro-generated human Langerhans cells via a lectin of galactomannan specificity. *Clin Exp Immunol.* 2003; 133(3): 370-7.

Pie S, Truffa-Bachi M, Pla M, Nauciel C. Th-1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. *Infect Immun.* 1997; 65(11): 4509-14.

Pietrella D, Bistoni G, Corbucci C, Perito S, Vecchiarelli A. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8(4): 602-12.

Prina E, Abdil SZ, Lebastardl M, Perret E, Winter N, Antoine JC. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt2): 315-25, 2004

Puccia R, Schenkman S, Gorin AJP, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986; 53(1): 199-206.

Puccia R, Travassos LR. 43 kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical reactions with sera from patients with

paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. J Clin Microbiol. 1991; 29(8): 1610-5.

Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin-10 and transforming growth factor beta. J Exp Med. 1995; 181(5): 1887-92.

Reiner NE, Wilson CB, McMaster WR, Burchett SK. Modulation of *in vitro* monocyte cytokine response to *Leishmania donovani*, Interferon- γ prevents parasite-induced inhibition to interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor- α and interleukin 1. J Clin Invest. 1990; 85(6): 1914-24.

Repnik U, Knezevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. J Immun Methods. 2003; 278(1-2): 283-92.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia. 1985; 23(5): 323-34.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2004 Aug;42(4):379-83.

Richards JO, Ampel NM, Galgiani JN, Lake DF. Dendritic cells pulsed with *Coccidioides immitis* lysate induce antigen-specific naive T cell activation. J Infect Dis. 2001; 184(9): 1220-4.

Richards JO, Ampel NM, Lake DF. Reversal of coccidioidal anergy *in vitro* by dendritic cells from patients with disseminated Coccidioidomycosis. J Immunol. 2002; 169(4): 2020-5.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch, PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating Dendritic cells progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994; 180(1): 83-93.

Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of Paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine*. 2002; 18(3): 149-57.

Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol*. 2005; 114(1): 86-94.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium -to- yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 1988; 56(3): 711-3.

San-Blas G, Travassos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VM, Knox Y, Gow NA. Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol*. 2000;38 Suppl 1:79-86

Sano A, Nishimura K, Horie Y, Franco M, Mendes RP, Coelho KI, Scapolio SH, Fukushima K, De Camargo ZP, Miyaji M, Montenegro MR. Antigenic similarities to *Paracoccidioides brasiliensis* in thermo-dependent dimorphic fungi isolated from soil in Botucatu, SP, Brazil. *Mycopathologia*. 1997; 138(1):37-41.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(3):297-310.

Shortman K, Vremec D, Corcoran LM, Georgopoulos K, Lucas K, Wu L. The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol Rev.* 1998; 165: 39-46.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and Human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(3): 151-161.

Silva-Vergara M L, Martinez R, Camargo Z P, Malta MHB, Maffei CML, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol.* 2000; 38(3): 193-9.

Smith AL, Fazekas De St, Groth B. Antigen pulsed CD8 alpha + dendritic cells generate an immune response after subcutaneous infection without homing to the draining lymph node. *J Exp Med.* 1999; 189(3): 593-8.

Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62(4): 1465-9.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis.* P 109-130, CRC Press, 1993

Watanabe K, Kagaya K, Yamada T, Fukazawa Y. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect Immun.* 1991; 59(2): 521-8.

Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 1997; 185(2): 317-28.

Wozniak KL, Vyas JM, Levitzi SM. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infect.Immun.*2006; 74(7): 3817–24.

Wu-Hsieh BA, Lu GS, Franco MF, Hoffman FM. Early activation of splenic macrophages by tumor necrosis factor alpha is important in determining the outcome of experimental histoplasmosis in mice. *Infect. Immun.* 1992; 60(10): 4230-8.

Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med.*1996, 184(3): 903-11.

Yarzabal LA, Bout D, Naquira F, Fruit J, Andrieu, S. Identification and purification of the specific antigen of *P. brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Saboraudia.* 1977; 15(1): 79-85.

Zehn D, Cohen CJ, Reiter Y, Walden P. Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 2004; 34(6): 1551-60.

Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.*1995; 63(8): 3231-4.