

**LARISSA NARA ALEGRINI LONGUI**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS NK (CÉLULAS CD56<sup>+</sup>) NA  
RESPOSTA AO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**CAMPINAS**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**LARISSA NARA ALEGRINI LONGUI**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS NK (CÉLULAS CD56<sup>+</sup>) NA  
RESPOSTA AO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Médicas, Área de Concentração em Ciências  
Biomédicas.

**Orientador: Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni**

**Coorientadora: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta**

**CAMPINAS**

**2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA**  
**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L867a Longui, Larissa Nara Alegrini  
Avaliação da participação das células NK (células CD56+) na resposta ao paracoccidioides brasiliensis / Larissa Nara Alegrini Longui. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Ronei Luciano Mamoni, Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Citocinas. 3. Células matadoras naturais. I. Mamoni, Ronei Luciano. II. Blotta, Maria Heloisa Souza Lima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Evaluation of the role of natural killer cells (CD56+ cells) in the immunological response against paracoccidioides brasiliensis infection**

**Keywords:** • Paracoccidioidomycosis  
• Cytokines  
• Killer cells, natural

Titulação: Mestre em Ciências Médicas  
**Área de concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni  
Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares  
Prof. Dr. Gil Bernard

**Data da defesa: 19-08-2010**

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Larissa Nara Alegrini Longui**

Orientador(a): Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

**Membros:**

1. Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni -

2. Prof. Dr. Gil Benardi -

3. Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 19/08/2010**



Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).





## ***DEDICATÓRIA***

Dedico esse trabalho a meus queridos e amados pais Fernando e Angélica e meu amado marido Evandro, por terem acreditado sempre em mim.



## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado a chegar até a conclusão deste trabalho.

A meu pai Fernando e minha mãe Angélica por sempre me incentivarem em meus sonhos, por acreditarem em mim e por todo amor e dedicação que tiveram comigo. Ao meu irmão Vitor por estar sempre ao meu lado mesmo que longe.

Ao meu marido Evandro, por me incentivar em cada momento, por todo apoio e carinho, por estar sempre ao meu lado, por me amar sempre, pela paciência infinita e por todo o tempo que me ausentei para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Ronei, por ter me aceitado como sua aluna, pelo muito que me ensinou, e com paciência me ajudou em todos os detalhes deste projeto inclusive dedicando seu tempo na bancada e dividindo suas experiências comigo. Muito obrigada!

A Dra Heloísa por ter me aceitado em seu laboratório e acreditado em mim. Pelas conversas e por todo o incentivo que tive por meio dela.

Aos meus amigos de laboratório Rômulo e Carol, por todo esse tempo de amizade e carinho que vocês tem me proporcionado. A Fernanda, Ana Lúcia, Fábio, Munir, Rosiane e Lisandra pelos momentos de descontração, conversas e pela amizade. A Marcinha (minha companheira de coleta) e a Carol do CIPOI por terem me ajudado muito.

A minha querida amiga Maria Carolina por todas as conversas que tivemos pela troca de experiências e principalmente sua amizade.

Aos meus amigos Cyntia, Rachel, Adriano Okumoto, Vânia e muitos outros que sempre estiveram comigo me dando muito apoio.

Aos professores da Banca Examinadora Ângela M. V. C. Soares, Gil Benard e Wirla Maria S. C. Tamashiro pela leitura da dissertação e pelas sugestões e correções.

Agradeço a Dra Ângela Maria Victoriano de Campos Soares da Unesp de Botucatu que cedeu as cepas dos fungos Pb18 e Pb265, pois sem eles não haveria possibilidade de realizar este trabalho. E a Luzia (funcionária da Microbiologia) que cultivou e cuidou dos fungos até o momento do uso.

Ao Dr. Alexandre Eduardo Nowill, por ceder o citometro de fluxo e a Fundação Salvador Arena de São Paulo.

Aos pacientes do ambulatório de moléstias infecciosas pela doação das amostras de sangue que permitiram a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos os que fizeram parte direta e indiretamente deste trabalho. Muito Obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- BSA Soro Albumina Bovina
- CFU Unidade Formadora de Colônia
- CMSP Células Mononucleares do Sangue Periférico
- CFSE “Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester “
- DEPC Dietilpirocarbonato
- ELISA “Enzyme Linked Immunosorbent assay” – ensaio imunoenzimático de absorção
- FA Forma Adulta da paracoccidiodomicose
- FJ Forma Juvenil da paracoccidiodomicose
- IFN Interferon
- Ig Imunoglobulina
- IL Interleucina
- IMF Intensidade Média de Fluorescência
- ITAM Domínio de ativação baseado em tirosina associado a imunoreceptores
- ITIM Domínio de inibição baseado em tirosina associado a imunoreceptores
- KIR “Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors” – Receptores tipo imunoglobulina de células “Natural Killer”
- LDH Lactato Desidrogenase
- LPA Poliacrilamida Linear
- mAb Anticorpo Monoclonal

- MHC                   Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MIC                   “Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related”
- NK                    Células “Natural Killer”
- NKG2D               “Natural Killer Gene Complex 2D”
- NKT                   Linfócitos T “Natural Killer”
- OPD                   “Ortho-Phenylenediamine Dihydrochloride”
- PBS                   Solução Salina Tamponada com Fostato
- PCM                   Paracoccidioidomicose
- qRT-PCR             Reação de cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa  
Quantitativa (PCR em tempo real)
- RPM                   Rotação por Minuto
- TBS                   Solução Salina Tamponada com Tris
- TCR                   Receptor de Células T
- TGF                   Fator de Transformação de Crescimento
- Th                    T “helper” (auxiliar)
- THT                   Teste de Hipersensibilidade tipo Tardia
- TMB                   Tetrametilbenzidina
- TNF                   Fator de Necrose Tumoral
- ULBP                 “Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 Binding Protein”

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 3.1</b> – Análise por SDS-PAGE e imunoblot das frações protéicas do antígeno celular de <i>P. brasiliensis</i> (cAg).....	51
<b>Figura 4.1</b> – Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> (células NK) e CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> (células NKT) no sangue periférico.....	76
<b>Figura 4.2</b> – Análise da capacidade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> isoladas de controles e pacientes com doença ativa ou tratados.....	77
<b>Figura 4.3</b> – Números de CFUs/mL em sobrenadantes obtidas após coculturas de células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265, células CD56 <sup>+</sup> e CMSP.....	78
<b>Figura 4.4</b> - Números de CFUs/mL em sobrenadantes obtidas após coculturas de células estimuladas com IL-15.....	80
<b>Figura 4.5</b> - Números de CFUs/mL em sobrenadantes obtidas após coculturas de células CD56 <sup>+</sup> tratadas com inibidores específicos de constituintes de grânulos citotóxicos.....	82
<b>Figura 4.6</b> – Avaliação da atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> de indivíduos controle e pacientes contra as células alvo infectadas com células fungicas da cepa Pb18 e Pb265.....	83
<b>Figura 4.7</b> – Comparação da atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> contra células-alvo infectadas com <i>P. brasiliensis</i> das cepas virulenta e avirulenta	84
<b>Figura 4.8</b> – Avaliação da atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> de indivíduos controle e pacientes contra as células-alvo infectadas com a cepa Pb18 e Pb265 após estímulo com IL-15.....	85
<b>Figura 4.9</b> – Atividade citotóxica de CD56 <sup>+</sup> de controles normais contra células alvo infectadas com células fúngicas da cepa Pb18, após tratamento com inibidores específicos de constituintes de grânulos citotóxicos.....	87
<b>Figura 4.10</b> – Quantificação relativa da expressão de RNAm para	



granzima A, granzima B, perforina e granulicina em células CD56 <sup>+</sup> .....	89
<b>Figura 4.11</b> – Análise por citometria de fluxo da expressão dos constituintes de grânulos citotóxicos por células CD56 <sup>+</sup> .....	91
<b>Figura 4.12</b> – Quantificação relativa da expressão do RNAm para granulicina em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e pacientes.....	93
<b>Figura 4.13</b> – Quantificação relativa da expressão do RNAm para granulicina em populações de células separadas por isolamento imunomagnético.....	94
<b>Figura 4.14</b> – Quantificação relativa da expressão do RNAm para granulicina em populações de células separadas por isolamento imunomagnético após estímulo com IL-15.....	95
<b>Figura 4.15</b> – Níveis de granulicina no sobrenadante de cocultura de células CD56 <sup>+</sup> ou CMSP com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....	96
<b>Figura 4.16</b> – Análise por citometria de fluxo da expressão de CD69 em células CD56 <sup>+</sup> .....	99
<b>Figura 4.17</b> – Análise por citometria de fluxo da expressão de CD25 em células CD56 <sup>+</sup> .....	100
<b>Figura 4.18</b> – Quantificação relativa da expressão do RNAm para NKG2D, KIR2 e KIR3DL1.....	102
<b>Figura 4.19</b> – Análise por citometria de fluxo da expressão de NKG2D, KIR2DL2/L3/S2, KIR3DL1 em células CD56 <sup>+</sup> .....	104
<b>Figura 4.20</b> – Quantificação relativa da expressão do RNAm para IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ e TNF- $\alpha$ em células CD56 <sup>+</sup> .....	106
<b>Figura 4.21</b> – Análise da produção de IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ e TNF- $\alpha$ no sobrenadante de culturas de células CD56 <sup>+</sup> .....	107
<b>Figura 4.22</b> – Análise por citometria de fluxo da expressão de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ por células CD56 <sup>+</sup> .....	109
<b>Figura 4.23</b> – Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL-15 em culturas de células CD14 <sup>+</sup> estimuladas com leveduras de <i>P.</i> <i>brasiliensis</i> .....	111

<b>Figura 4.24</b> – Análise por citometria de fluxo da expressão de MHC de classe I, MHC de classe II, MICA/B, CD80 e CD86 em monócitos.....	112
<b>Figura 8.1</b> – “Dot-plots” da população de células CD56 <sup>+</sup> e CD14 <sup>+</sup> após separação imunomagnética.....	165
<b>Figura 8.2</b> – Histograma representativo da marcação com CFSE das células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> .....	167
<b>Figura 8.3</b> - “Dot-plots” representativos da padronização da infecção de monócitos por células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> .....	168
<b>Figura 8.4</b> – Histogramas representativos do resultado do tratamento de células CD56 <sup>+</sup> por agentes que interferem com os componentes dos grânulos citotóxicos.....	169
<b>Figura 8.5</b> – Estratégia utilizada para a determinação da porcentagem de células CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> (NK) e CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> (NKT) no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e indivíduos do grupo controle.....	170
<b>Figura 8.6</b> – Estratégia utilizada para a análise da expressão dos diversos parâmetros de superfície e intracelulares nas células CD56 <sup>+</sup> .....	171
<b>Figura 8.7</b> – Estratégia utilizada para análise da expressão dos diversos parâmetros de superfície nas células CD14 <sup>+</sup> .....	172
<b>Figura 8.8</b> – Gráficos de amplificação e curvas-padrão de resultados da padronização da eficiência das reações de qRT-PCR para quantificação do RNAm.....	173
<b>Figura 8.9</b> – Curvas de “melting” de resultados obtidos em equipamentos de PCR em tempo real.....	176
<b>Figura 8.10</b> – “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos em células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas.....	178
<b>Figura 8.11</b> – “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos em células CD56 <sup>+</sup> estimuladas com leveduras de <i>P.brasiliensis</i> .....	179
<b>Figura 8.12</b> – “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos em células CD56 <sup>+</sup> estimuladas com IL-15.....	180
<b>Figura 8.13</b> – “Dot-plots” representativos da expressão de CD69 em	

células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas ou estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou com IL-15.....	181
<b>Figura 8.14</b> – “Dot-plots” representativos da expressão de CD25 em células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas ou estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou com IL-15.....	182
<b>Figura 8.15</b> – “Dot-plots” representativos da expressão de NKG2D em células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas ou estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou com IL-15.....	183
<b>Figura 8.16</b> – “Dot-plots” representativos da expressão de KIR2DL2/L3/S2 em células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas ou estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou com IL-15.....	184
<b>Figura 8.17</b> – “Dot-plots” representativos da expressão de KIR3DL1 em células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas ou estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou com IL-15.....	185
<b>Figura 8.18</b> – “Dot-plots” derivados da análise da expressão dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1 em células CD56 <sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose.....	186
<b>Figura 8.19</b> - “Dot-plots” derivados da análise da expressão dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1 em células CD56 <sup>+</sup> de indivíduos do grupo controle.....	187
<b>Figura 8.20</b> - “Dot-plots” representativos da expressão de IFN- $\gamma$ em células CD56 <sup>+</sup> não estimuladas ou estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou com IL-15.....	188

## SUMÁRIO

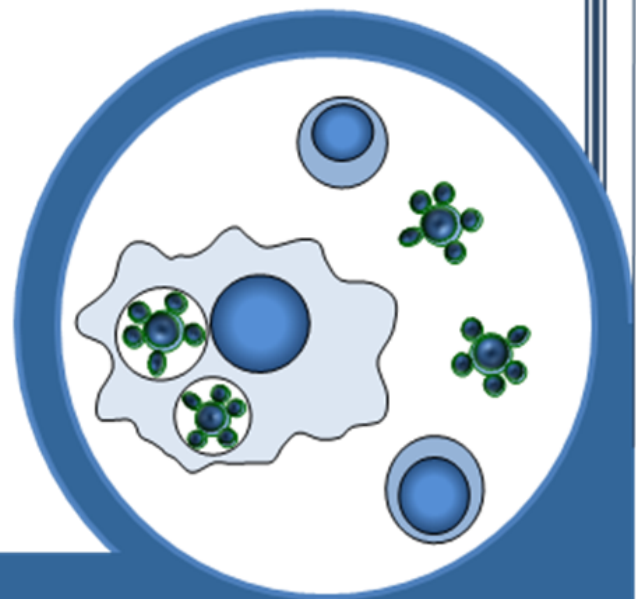
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	33
2.1 Objetivo.....	45
2.2 Objetivos específicos e abordagem experimental.....	45
<b>3. CASUÍSTICA, MATERIAL E METODOS</b> .....	49
3.1 Casuística .....	49
3.2 Obtenção de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....	50
3.3 Obtenção do antígeno celular de <i>P. brasiliensis</i> (cAg).....	50
3.4 Separação imunomagnética de subpopulações celulares a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) .....	52
3.5 Avaliação da atividade fungicida direta de células CD56 <sup>+</sup> sobre leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....	54
3.6 Determinação da atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> (natural killer) sobre células alvo através da dosagem da liberação de cromo. ....	55
3.7 Determinação da atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> sobre células alvo (monócitos infectados com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ) por meio da dosagem de LDH.....	56
3.8 Avaliação da participação de grânulos na atividade fungicida direta e na resposta citotóxica contra células alvo. ....	58
3.9 Citometria de fluxo .....	59
3.10 Avaliação da expressão do RNA mensageiro .....	63
3.10.1 Condições de cultura.....	63
3.10.2 Extração de RNA.....	64
3.10.3 Síntese de cDNA.....	64
3.10.4 Protocolo de qRT-PCR.....	66
3.11 ELISA para detecção de granulicina no sobrenadante de cultura.....	68
3.12 ELISA para detecção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ no sobrenadante de cultura .....	70

3.13	Análise estatística .....	71
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
4.1	Pacientes com paracoccidiodomicose e controles apresentam a mesma porcentagem de células CD56 <sup>+</sup> no sangue periférico, mas a atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose é menor do que de indivíduos do grupo controle.....	75
4.2	A atividade fungicida direta de células CD56 <sup>+</sup> difere entre os grupos analisados.....	77
4.3	A adição de IL-15 nas coculturas aumenta a atividade fungicida de células CD56 <sup>+</sup> .....	79
4.4	A atividade fungicida direta de células CD56 <sup>+</sup> é dependente de grânulos, mas é independente de perforina. ....	80
4.5	Atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> contra células-alvo apresenta padrão “dose-dependente” e é maior nos indivíduos controle.....	82
4.6	A atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> contra células-alvo é influenciada positivamente pela presença de IL-15. ....	84
4.7	A atividade citotóxica de células CD56 <sup>+</sup> contra células-alvo é dependente de grânulos e da perforina.....	86
4.8	Células CD56 <sup>+</sup> estimuladas com leveduras de <i>P.brasiliensis</i> e IL-15 aumentam a expressão do RNAm para os constituintes dos grânulos citotóxicos.....	87
4.9	Células CD56 <sup>+</sup> de pacientes e de indivíduos controle estimuladas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> e IL-15 diferem quanto à produção dos constituintes dos grânulos citotóxicos.....	89
4.10	Células de pacientes com paracoccidiodomicose ativa expressam menor quantidade do RNAm para granulisina do que células de controles normais. ....	92
4.11	Granulisina é liberada por células CD56 <sup>+</sup> de indivíduos do grupo controle e pacientes com doença ativa em coculturas com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> . Níveis de granulisina aumentam com IL15. ....	95

4.12	A exposição de células CD56 <sup>+</sup> a leveduras de <i>P. brasiliensis</i> leva ao aumento de marcadores de ativação no grupo de indivíduos controle, mas não de pacientes com paracoccidiodomicose. A IL-15 aumenta a expressão nos dois grupos .....	97
4.13	Avaliação da expressão do receptor de ativação NKG2D e dos receptores de inibição KIR2 e KIR3DL1 em células CD56 <sup>+</sup> .....	101
4.14	Células CD56 <sup>+</sup> estimuladas com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> produzem IFN- $\gamma$ .....	105
4.15	Células CD14 <sup>+</sup> infectadas com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> aumentam a expressão do RNAm para IL-15. ....	110
4.16	Células CD14 <sup>+</sup> cultivadas na presença de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> diminuem a expressão de moléculas de MHC de classe I em sua superfície. ....	111
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	117
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	131
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	137
<b>8.</b>	<b>APÊNDICE</b> .....	159
8.1	Tabela descritiva dos pacientes e indivíduos do grupo controle .....	159
8.2	Termo de consentimento pós-informação .....	161
8.3	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP .....	163
8.4	Análise da pureza de células CD56 <sup>+</sup> e CD14 <sup>+</sup> obtidas de CMSP após separação imunomagnética.....	165
8.5	Avaliação da infecção de células CD14 <sup>+</sup> com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo. ....	166
8.6	Avaliação do efeito do tratamento das células CD56 <sup>+</sup> com SrCl, concanamicina e EGTA sobre a expressão dos componentes dos grânulos citotóxicos .....	169

8.7	Estratégia utilizada para avaliar a porcentagem de células CD56 <sup>+</sup> (NK e NKT) no sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos do grupo controle.....	170
8.8	Estratégia utilizada para avaliar a porcentagem de células CD56 <sup>bright</sup> , CD56 <sup>dim</sup> e CD56 total expressando diferentes parâmetros de superfície e intracelulares. ....	171
8.9	Estratégia utilizada para avaliar expressão de moléculas de superfície em monócitos. ....	172
8.10	Determinação da eficiência e especificidade de amplificação dos primers utilizados na técnica de qRT-PCR.....	173
8.11	“Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos por células CD56 <sup>+</sup> .....	178
8.12	“Dot-plots” representativos da expressão de marcadores de ativação (CD69 e CD25) por células CD56 <sup>+</sup> .....	181
8.13	“Dot-plots” representativos da expressão de receptores de ativação (NKG2D) e de inibição (KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1) por células CD56 <sup>+</sup> .....	183
8.14	Expressão dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1 em células CD56 <sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos do grupo controle.....	186
8.15	“Dot-plots” representativos da expressão de IFN- $\gamma$ por células CD56 <sup>+</sup> ..	188

# *Resumo*





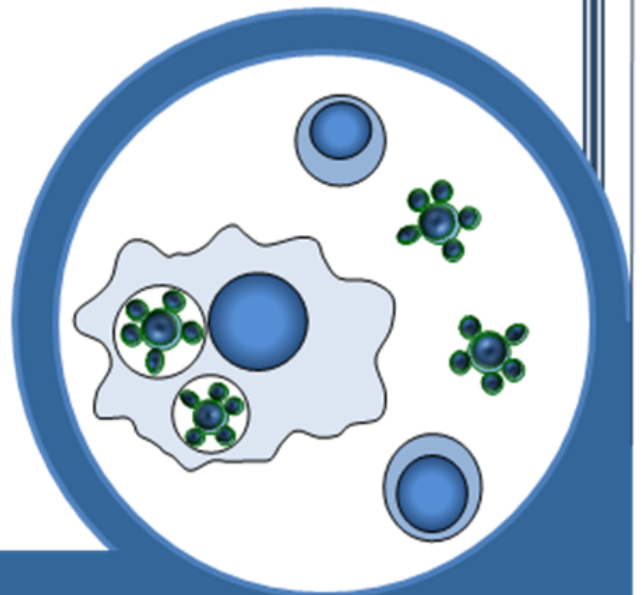


## RESUMO

Tradicionalmente o papel das células NK na resposta imunológica tem sido associado com a resistência à infecção viral e tumores, porém estudos recentes apontam para a participação destas células na resposta imunológica contra outras doenças infecciosas. O objetivo deste estudo foi avaliar a possível participação de células NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) na resposta imunológica ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Foram utilizadas células CD56<sup>+</sup> isoladas por meio imunomagnético provenientes de pacientes com paracoccidioidomicose e de indivíduos controle. As células CD56<sup>+</sup> foram avaliadas quanto à capacidade citotóxica direta contra leveduras de *P. brasiliensis* (cepa virulenta – Pb18 e avirulenta – Pb265) e contra células-alvo (monócitos) infectadas com leveduras de ambas as cepas. Também foi avaliada a expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos (granzima A, B, perforina e granulicina), receptores de ativação (NKG2D) e de inibição (KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1), marcadores de ativação (CD69 e CD25), assim como a produção de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) por meio de PCR em tempo real e por citometria de fluxo. A participação da IL-15 na ativação das células NK foi avaliada pela adição da citocina recombinante em alguns experimentos. Para avaliar a participação dos grânulos na atividade citotóxica direta e contra células-alvo em alguns experimentos as células foram tratadas com inibidores específicos (SrCl<sub>2</sub>, concanamina A ou EGTA). Os resultados demonstraram que células de pacientes apresentam resposta citotóxica (direta e contra células-alvo) inferior àquela observada nos indivíduos controle. A citotoxicidade direta foi dependente de grânulos, mas independente de perforina, enquanto que a citotoxicidade contra

células-alvo foi dependente de perforina. A expressão de granulicina (RNAm e proteína) foi maior nas células de indivíduos controle. Além disso, observamos que células CD56<sup>+</sup> apresentam a capacidade de secretar essa proteína após o estímulo com leveduras de *P. brasiliensis*. Também observamos que as células CD56<sup>+</sup> de doadores normais são ativadas (aumentam a expressão de CD69 e CD25) quando estimuladas com o fungo, enquanto as células NK de pacientes não mostraram esse aumento, a não ser quando estimuladas com IL-15. Estes resultados demonstraram que as células CD56<sup>+</sup> podem participar ativamente da resposta imunológica contra o *P. brasiliensis*, podendo contribuir tanto para a morte direta do fungo como de células infectadas, e que a granulicina pode desempenhar um papel preponderante no controle da infecção pelo *P. brasiliensis*. Outro fato importante observado foi que as células CD56<sup>+</sup> quando estimuladas por células leveduriformes de *P. brasiliensis* produzem e secretam IFN- $\gamma$ , uma citocina com atuação importante na ativação de outras células do sistema imunológico como macrófagos e linfócitos, e dessa forma pode contribuir para o desenvolvimento da resposta imunológica adquirida subsequente à infecção.

# *Abstract*



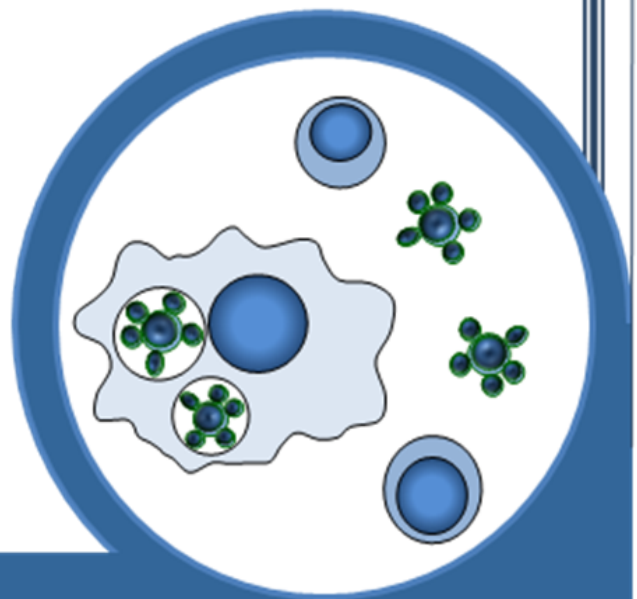


## ABSTRACT

Besides their role in viral infection and tumor resistance, recent studies have showed that NK cells also participate in the immune response against other infectious diseases. The aim of this study was to evaluate the possible role for NK cells (CD56<sup>+</sup>) in the immune response against the fungi *Paracoccidioides brasiliensis*. CD56<sup>+</sup> cells from patients with paracoccidioidomycosis and healthy individuals were isolated by immunomagnetic columns and antibodies. We evaluated the capacity of the direct killing of *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 virulent strain and Pb285 avirulent strain), as well as, the ability to kill infected target cells (monocytes infected with either virulent or avirulent strains). The CD56<sup>+</sup> cells also were assessed in order to evaluate the expression of cytotoxic granules (granzyme A, B, perforin and granulysin) and the expression of the activation receptor NKG2D, the inhibition receptors KIR2DL2/L3/S2 and KIR3DL1 and the activation molecules CD69 and CD25. We also determine the capability of production and release of cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) using Real Time PCR, flow cytometry and ELISA. The role of IL-15 was analyzed by the addition of recombinant cytokine in some experiments. To determine if the cytotoxic activity was dependent of granules, cell cultures were supplemented with specific inhibitors which prevent granule release. The results showed that cells from patients present a lower cytotoxic response when compared to healthy individuals. The direct cytotoxicity seems to be granule-dependent but independent on perforin, whereas the cytotoxicity against target cells showed to be perforin dependent. It was observed an augmented expression of granulysin (mRNA and protein) in cells from

controls, and that CD56<sup>+</sup> cells are able to produce and release granulysin after stimulation with *P.brasiliensis* yeast cells. Furthermore, the analyses of CD56<sup>+</sup> cells from controls showed elevated expression of CD25 and CD69 after the stimulus with yeast cells, while cells from patients are only activated in the presence of IL-15. These results demonstrated that CD56<sup>+</sup> cells can participate actively of the immune response against the *P. brasiliensis* infection either by destroying directly yeast cells or by the recognition and killing of infected cells. Granulysin is the possible mediator of the cytotoxic effect observed in this study, once this protein is produced and released by CD56<sup>+</sup> cells. Another important data is the finding that CD56<sup>+</sup> cells are able to produce IFN- $\gamma$  after the stimulus, which could influence the subsequent acquired immunological response by stimulating others cells as macrophages and lymphocytes.

# *Introdução*







## 1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior incidência nos países da América Latina, sendo o Brasil o país que concentra o maior número de casos. A doença é causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* que na natureza ou em meio de cultura à temperatura de 25°C apresenta-se na forma miceliana e, quando à 37°C, em cultura ou no organismo do hospedeiro, se converte em células leveduriformes. A infecção provavelmente ocorre por meio da inalação de propágulos do fungo que se depositam nos pulmões causando lesões locais, ou que podem se disseminar via corrente sanguínea ou linfática para diversos órgãos como fígado, baço, glândulas suprarenais, medula óssea, mucosas e pele [1-3].

A infecção pelo *P. brasiliensis* pode ter três resultados: a PCM-infecção (PI), comum em indivíduos que residem ou trabalham em áreas endêmicas e que entram em contato com o fungo e que apresentam intensa resposta ao teste de hipersensibilidade tardia (THT) a antígenos fúngicos e não apresentam os sintomas da doença; a forma juvenil (FJ) encontrada em crianças e jovens de ambos os sexos e caracterizada pelo acometimento dos linfonodos, fígado, baço e disfunção na medula óssea, semelhante àquela encontrada em doenças linfoproliferativas; e a forma adulta (FA) ou crônica que acomete majoritariamente homens adultos entre 30 e 60 anos. A forma adulta apresenta manifestações clínicas que variam desde lesões pulmonares isoladas (forma unifocal) ao acometimento sistêmico (forma multifocal) [4-6].

Cada uma das formas da PCM é caracterizada por diferentes padrões de resposta imunológica, fato que se reflete nos tipos de imunoglobulinas e de citocinas produzidas. Na forma adulta unifocal observa-se a produção aumentada de IgG1, ao passo que na formas mais graves e disseminadas ocorre maior produção de IgE e IgG4, assim como na forma juvenil que apresenta também elevada produção de IgA [6-10]. Durante o tratamento esse perfil se modifica com acentuada queda de IgG1 na forma adulta e de IgE na forma juvenil, enquanto os níveis de IgG4 se mantêm constantes durante todo o tratamento na forma juvenil [11, 12]. Esses dados correlacionam-se com aqueles obtidos a partir de estudos com modelos experimentais nos quais a resistência à doença pode ser associada com a produção de IgG2a e a suscetibilidade com altos níveis de IgG1 [13].

Tem sido observado ainda que a forma juvenil e a PCM-infecção apresentam-se como pólos de resposta Th2 e Th1 respectivamente, e que a forma adulta revela um padrão intermediário. Esses padrões são caracterizados pela produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  pelos indivíduos com PI ou com a forma adulta unifocal, também caracterizadas por reação positiva ao THT e baixos títulos séricos de anticorpos; enquanto a FA disseminada e FJ são caracterizadas por resposta predominantemente Th2 com altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$ 1, eosinofilia e produção diminuída de IFN- $\gamma$ , além de altos títulos de anticorpos no soro e resposta a THT negativa [6, 9, 10, 12].

Muitos avanços foram feitos nos últimos anos quanto à caracterização da resposta imunológica à infecção pelo *P. brasiliensis*, principalmente após o desenvolvimento de modelos experimentais da infecção. Os padrões de evolução

da doença podem ser associados diretamente ao tipo de resposta imunológica adaptativa desencadeada após a infecção. Ainda não se sabe, porém, quais os fatores que influenciam a polarização da resposta adaptativa na PCM, mas assim como em outras patologias os eventos que ocorrem no início da infecção devem ter papel preponderante nesse fenômeno [16-20].

A resposta imunológica inata vem ganhando cada vez mais atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que é fundamental na fase inicial da infecção e, conseqüentemente, determina o tipo de resposta adaptativa, controlando a diferenciação das células efetoras. As células que participam da resposta imunológica inata podem ser agrupadas em dois tipos principais: aquelas que apresentam atividade fagocítica como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, sendo que essas últimas também desempenham papel de grande importância na apresentação de antígenos; e células de origem linfóide como células “natural killer” (NK), células NKT e linfócitos que apresentam o TCR com cadeias gama e delta ( $T\gamma\delta$ ); essas células ao contrário dos outros linfócitos participam dos eventos iniciais após a infecção, por apresentarem uma forma de reconhecimento de antígenos mais restrita e diferenciada [21, 22].

As células NK constituem um importante subgrupo de células de origem linfóide, inicialmente descritas como fundamentais na resistência a tumores e infecções virais, e que mais recentemente têm sido associadas à resistência a outros agentes patogênicos como bactérias e fungos intracelulares [23-25].

Em anos recentes, alguns estudos apontam para a heterogeneidade das células NK, tendo sido identificadas subpopulações de células que aparentemente

desempenham funções distintas [26-28]. Essas diferentes populações são caracterizadas fenotipicamente por meio da intensidade de expressão da molécula de CD56 em sua superfície. Assim, células com alta expressão de CD56 são denominadas de CD56<sup>bright</sup> e representam uma pequena população no sangue periférico (aproximadamente 10% das células NK); por outro lado, células com baixa expressão de CD56 são denominadas de CD56<sup>dim</sup> representando a maioria das células NK encontradas na periferia. Quando ativadas (principalmente por citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18) as células CD56<sup>bright</sup> proliferam e secretam grandes quantidades de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas apresentam baixa capacidade citotóxica. Ao contrário, as CD56<sup>dim</sup> possuem pouca capacidade proliferativa e produzem pequenas quantidades de citocinas, porém apresentam alta atividade citotóxica [26-29].

A regulação da ativação de células NK, para que estas desempenhem sua atividade citotóxica contra células-alvo (infectadas ou transformadas), é feita por meio de um balanço complexo entre os estímulos recebidos por receptores inibitórios e estimulatórios. Os receptores inibitórios (p.e. membros da família KIR – “Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors” – Receptores tipo imunoglobulina de células “Natural Killer”) em geral reconhecem e se ligam a moléculas de MHC de classe I (Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I) clássicos ou não clássicos e dessa forma reagem “à perda do próprio”, ou seja, a diminuição da expressão de seus ligantes na superfície de células alvo, um evento comum em células infectadas por vírus ou transformadas. Já os receptores estimulatórios (p.e. NKG2D – “Natural Killer Gene Complex 2D”) reconhecem e se ligam a

moléculas cuja estrutura é similar a moléculas de MHC, como as moléculas MICA, MICB (“major histocompatibility complex class I chain-related”) e ULBPs (“human cytomegalovirus glycoprotein UL16 binding proteins”)[24, 30-37].

Os receptores do tipo KIR são expressos por células NK e algumas populações de linfócitos T [38-40], sendo que nas células NK a expressão é restrita à população CD56<sup>dim</sup> [26-29]. Existe uma grande quantidade de receptores que pertencem à família KIR, esses apresentam um grau de polimorfismo bastante acentuado, relacionados ao polimorfismo das moléculas de MHC de classe I [41]. Os receptores do tipo KIR sinalizam por meio da ativação de domínios intracitoplasmáticos do tipo ITIM (domínio de inibição baseado em tirosina associado a imunoreceptores), que por sua vez ativam tirosina-fosfatases que desfosforilam ou impedem a fosforilação de enzimas intracelulares relacionadas à ativação das células [41].

O receptor de ativação NKG2D é uma molécula com estrutura semelhante às lectinas do tipo C e iniciam as vias de ativação das células NK por meio de domínios intracelulares do tipo ITAM (domínio de ativação baseado em tirosina associado a imunoreceptores), que geralmente se associam a moléculas adaptadoras como o DAP10 [42, 43].

Após a ativação, as células NK liberam os constituintes dos grânulos citotóxicos (perforina, granzimas e granulicina) na superfície da célula-alvo, levando-as à morte celular programada (apoptose). Além de atuarem sobre células infectadas, as células NK também apresentam efeitos antifúngicos diretos [23]. Em estudo realizado com *Cryptococcus neoformans* observou-se, que ao contrário dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, as células NK apresentavam atividade antifúngica

de modo constitutivo, isto é, não necessitavam de ativação prévia, e que essa atividade era dependente da presença de perforina e não de granulicina [44, 45].

A perforina é uma proteína que forma poros na membrana celular por um mecanismo dependente de cálcio, causando desequilíbrio osmótico e conseqüentemente a lise da célula exposta. A presença da perforina, também seria importante para a entrada das outras substâncias presentes nos grânulos (granzimas e granulicina) no citoplasma das células, uma vez que essas substâncias não são capazes de passar pela membrana [46, 47]. As granzimas, das quais são mais conhecidas as granzimas A e B, são enzimas com atividade proteolítica capazes de ativar mecanismos de apoptose principalmente pela ativação das caspases [46-48].

A granulicina assim como os outros constituintes dos grânulos citotóxicos é produzida e expressa por células NK e por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A granulicina é uma proteína com estrutura semelhante à saposina, é produzida sob a forma inativa (15 kDa), apresentando função biológica após sua conversão para a forma de 9 kDa. Seu mecanismo de atuação envolve a interação com lipídios presentes na estrutura de diversos patógenos, e tem a capacidade comprovada de causar a morte de bactérias, fungos e protozoários [49-54]. Deng e col. (2005) [50] demonstraram que a granulicina apresenta, além de suas atividades citotóxicas, função pró-inflamatória e quimiotática, atuando também na modulação da resposta inflamatória local. Sua participação tem sido apontada como fundamental no controle das infecções causadas por micobactérias, tanto na tuberculose como na hanseníase [55, 56]. Entretanto, apesar de apresentar uma potente ação sobre os patógenos, a granulicina depende da presença de perforina para atuar no interior

das células infectadas [57]. Na criptococose a citotoxicidade direta é aparentemente dependente da participação da granulísina e da presença da IL-15 [58].

A IL-15 é uma citocina produzida principalmente por monócitos e células dendríticas, com estrutura homóloga a da IL-2. Seu receptor é composto por 3 cadeias, sendo que duas ( $\beta$  e  $\gamma$ ) são compartilhadas com outras citocinas (IL-2, IL-7, etc), enquanto que a cadeia  $\alpha$  confere especificidade de ligação [59]. A IL-15 parece ser essencial para a ativação e manutenção das células citotóxicas, tanto das T CD8<sup>+</sup> como das células NK [60, 61]. Nas células T CD8<sup>+</sup> o estímulo com IL-15 resulta em efeitos similares aos que ocorrem quando do reconhecimento do antígeno via complexo TCR-CD3, participando portanto da manutenção do conjunto de células de memória [62] e da produção dos grânulos citotóxicos [63]. Em relação às células NK diversos estudos indicam a importância dessa citocina, tanto para a manutenção da viabilidade, quanto para a ativação de sua atividade citotóxica [64-67]. Tran e col. (2003) [68] demonstraram que a IL-15 leva a um aumento da atividade citotóxica de células NK contra bactérias e fungos.

Além da atividade citotóxica direta e contra células-alvo, as células NK participam da modulação da resposta imunológica por meio da produção de citocinas, em especial o IFN- $\gamma$  [34]. A produção de IFN- $\gamma$  por células NK é induzida por meio da estimulação direta de seus receptores ou de maneira indireta em resposta à presença de citocinas inflamatórias como IL-12, IL-18, IFN- $\alpha/\beta$  ou TNF- $\alpha$  [26, 69]. O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  produzido por células NK podem participar da ativação de macrófagos aumentando a sua capacidade de reconhecimento,



captura, processamento e apresentação de antígenos, bem como do aumento da sua atividade microbicida pela indução de mecanismos oxidativos [70]. Além dessa atuação sobre os macrófagos, estudos recentes apontam um papel importante das citocinas produzidas pelas células NK na modulação da ativação de células dendríticas e de outras células do sistema imunológico como os linfócitos T CD8<sup>+</sup> [71-73]. Por essas razões o IFN- $\gamma$  tem um papel crítico no controle de certas infecções, principalmente aquelas causadas por patógenos intracelulares. Como mencionado anteriormente, na paracoccidiodomicose, o IFN- $\gamma$  foi relacionado à resistência a doença, tanto na infecção experimental como na humana [6, 7, 9, 10, 74-78].

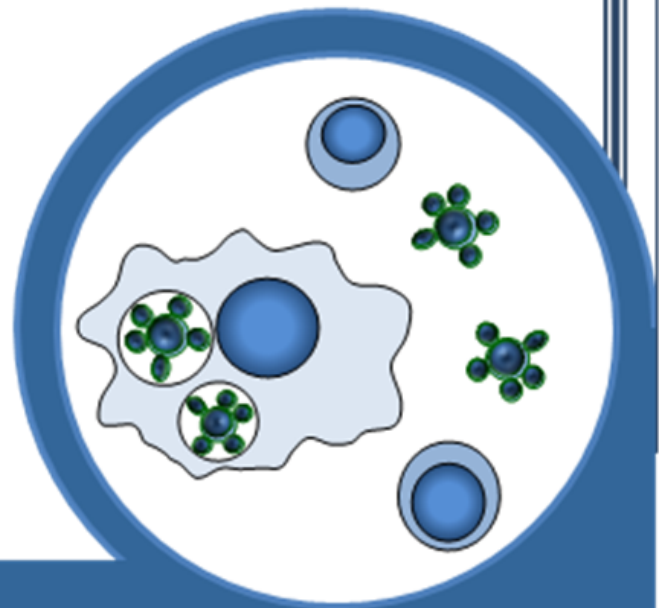
Na paracoccidiodomicose, poucos estudos têm sido realizados para averiguar o papel desempenhado pelas células NK na resposta imunológica desencadeada pelo fungo. Jimenez e Murphy (1984) [79] demonstraram que frações de células linfóides, provavelmente células NK, obtidas de camundongos apresentavam atividade citotóxica contra células infectadas com o *P. brasiliensis* e que também inibiam o crescimento de formas leveduriformes do fungo *in vitro*. Peraçoli e col. (1991) [80] verificaram que pacientes com a forma aguda da PCM apresentam um aumento no número de células NK na circulação, mas que essas células, entretanto, apresentam baixa atividade citotóxica, quando comparadas a células de indivíduos normais. Em um estudo realizado em hamsters infectados pelo *P. brasiliensis* foi observado que no período inicial da infecção ocorre um aumento do número de células NK circulantes, e que após 8 semanas diminuem em associação com a supressão da resposta imunológica mediada por células

[81]. Apesar dos estudos escassos na paracoccidiodomicose, células NK foram relacionadas à resistência a infecções causadas por *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum*, tanto por meio da produção de IFN- $\gamma$ , quanto pela destruição de células infectadas por mecanismos citotóxicos, dependentes de grânulos [44, 45, 57, 82-86]. As células NK (assim como os linfócitos T CD8<sup>+</sup>), aparentemente também podem agir diretamente sobre alguns patógenos como o *C. neoformans*, o *Toxoplasma gondii* e a *C. albicans* [87-89]. Apesar de ainda não ter sido possível determinar a importância da citotoxicidade direta *in vivo*, esse mecanismo poderia ser importante após a destruição da célula-alvo e liberação do patógeno no meio extracelular.

Como descrito acima, a participação das células NK na infecção humana pelo *P. brasiliensis* ainda é pouco conhecida. Os dados disponíveis sugerem que estas células possam desempenhar na paracoccidiodomicose, assim como em outras doenças, um papel importante no início da resposta imunológica ao fungo e, por conseguinte, influenciar o desenvolvimento da resposta imunológica adquirida. Dentre as funções dessas células estariam a destruição de células infectadas pelo fungo por meio de mecanismos citotóxicos, assim como a inibição do crescimento ou morte direta do fungo. Além disso, estas células poderiam ser uma fonte importante e precoce de IFN- $\gamma$  uma citocina essencial para a resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*.



# *Objetivos*





## **2. OBJETIVOS E ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

### **2.1 Objetivo**

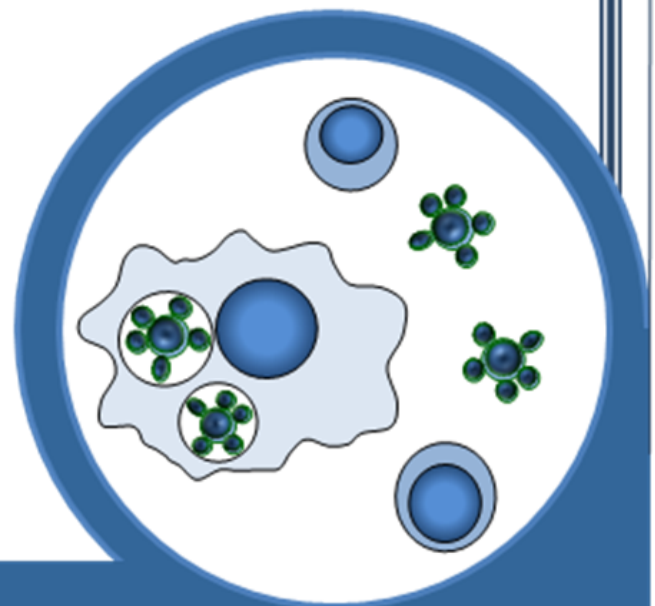
O objetivo deste trabalho é avaliar o papel das células CD56<sup>+</sup> na resposta imunológica ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

### **2.2 Objetivos específicos e abordagem experimental**

- Avaliar, por citometria de fluxo, o número de células CD56<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo controle) e pacientes com paracoccidioidomicose ativa.
- Comparar a atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> provenientes de pacientes com paracoccidioidomicose ativa e após o tratamento antifúngico, por meio de ensaio de liberação de cromo.
- Determinar se células CD56<sup>+</sup> apresentam capacidade citotóxica direta contra o fungo *P. brasiliensis* de duas cepas (Pb18 – virulenta e Pb265 - avirulenta). E comparar essa atividade entre pacientes e indivíduos do grupo controle.
- Avaliar, por meio de ensaio de liberação de LDH (lactato desidrogenase), a capacidade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> de pacientes e indivíduos do grupo controle contra células-alvo (monócitos – CD14<sup>+</sup>) infectadas com leveduras de *P. brasiliensis* de ambas as cepas.
- Determinar se a atividade citotóxica contra o *P. brasiliensis* e contra as células-alvo infectadas é mediada pelos grânulos citotóxicos e se essa resposta é dependente da participação da perforina, por meio do tratamento das células CD56<sup>+</sup> com inibidores de constituintes dos grânulos.

- Determinar, por meio de citometria de fluxo, ELISA e qRT-PCR, se as células CD56<sup>+</sup> de indivíduos do grupo controle e de pacientes com paracoccidioidomicose diferem quanto à expressão dos mediadores citotóxicos (perforina, granzima A, granzima B e granulicina), receptores de inibição (KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1) e de ativação (NKG2D) e quanto à produção de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ).
- Determinar se a exposição de células CD56<sup>+</sup> a leveduras de *P. brasiliensis* leva a ativação das mesmas, por meio da análise por citometria de fluxo da expressão de marcadores de ativação (CD69 e CD25).
- Determinar o efeito da IL-15 sobre as células CD56<sup>+</sup> quanto à resposta citotóxica direta e contra células-alvo infectadas, sobre a expressão de moléculas de superfície e sobre a produção dos constituintes dos grânulos citotóxicos e de citocinas.
- Determinar, por citometria de fluxo, se a exposição de monócitos a leveduras de *P. brasiliensis* leva a alteração na expressão de moléculas de superfície associadas à estimulação de células CD56<sup>+</sup> e de linfócitos (MHC de classe I e II, CD80, CD86 e MICA/B).
- Determinar, por qRT-PCR, se monócitos estimulados por leveduras de *P. brasiliensis* apresentam a capacidade de produzir IL15.

# *Material e Métodos*







### **3. CASUÍSTICA, MATERIAL E METODOS**

#### **3.1 Casuística**

Para a realização dos experimentos descritos neste trabalho foi utilizado um número variável de indivíduos saudáveis (controles normais) e pacientes com a forma adulta ou com a forma juvenil da paracoccidiodomicose, discriminados em cada um dos resultados.

Foram incluídos nesse estudo pacientes com a forma juvenil (FJ) e adulta (FA) da PCM, atendidos no ambulatório de moléstias infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Foram considerados pacientes do grupo “doença-ativa” (DA) aqueles incluídos antes do início (pós-diagnóstico) ou no máximo com 1 mês de tratamento, que ainda apresentavam sintomas e exames compatíveis com paracoccidiodomicose em atividade (**ver item 8.1 em apêndice**). Os pacientes do grupo tratado (DT), foram selecionados dentre aqueles que estão há pelo menos 3 meses sem tratamento, e que não apresentam nenhum sintoma ou exame laboratorial indicativo de doença em atividade (**ver item 8.1 em apêndice**). Os indivíduos do grupo controle (C) foram selecionados na zona endêmica de Campinas, principalmente no Bairro de Barão Geraldo (fazendas e hortas), próximo ao campus da UNICAMP e que apresentaram resultado negativo para o teste de hipersensibilidade tardia para antígenos fúngicos. Foram incluídos somente indivíduos que não apresentavam nenhum sintoma ou sinal clínico de doença infecciosa em atividade (**ver item 8.1 em apêndice**). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e aprovado (parecer nº 793/2007, CAAE: 0580.0.146.000-07)(**ver item**

**8.3 em “Apêndice”)** e todas as coletas foram feitas com o consentimento de pacientes e indivíduos-controle conforme termo de consentimento (**ver item 8.2 em “Apêndice”**).

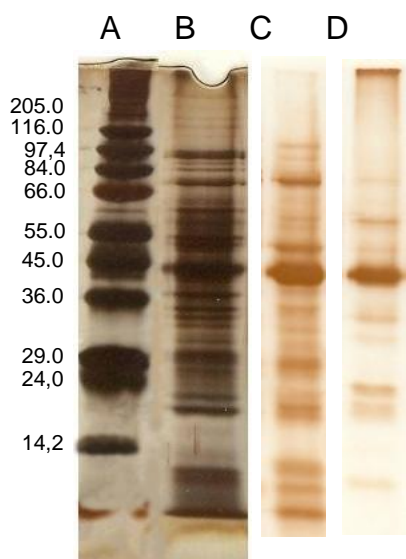
### **3.2 Obtenção de leveduras de *P. brasiliensis***

Culturas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* da cepa virulenta Pb18 e da cepa avirulenta Pb265 foram mantidas em estufa a 36°C em meio Fava-Netto por 7 dias. Após esse período, o fungo foi coletado por meio da lavagem do tubo com PBS estéril, e para a obtenção de células individuais a suspensão de leveduras foi agitada em vórtex em tubos de 50 mL contendo esferas de vidro de 4 mm de diâmetro por 5 minutos. Após a agitação os tubos foram incubados por 15 a 30 minutos a 37°C para a deposição das células não desagregadas e o sobrenadante transferido para outro tubo, a partir do qual o número de células leveduriformes viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer na presença de azul de tripan. Foram utilizadas suspensões contendo mais que 85% de células viáveis. O número de leveduras utilizado em cada experimento foi acertado conforme a necessidade.

### **3.3 Obtenção do antígeno celular de *P. brasiliensis* (cAg)**

Células leveduriformes (cepa B339) obtidas após 7 dias de crescimento em meio Fava-Netto, foram homogeneizadas por 1 minuto em banho de gelo, sonicadas em 3 ciclos de 1 minuto e incubadas por uma noite a 4°C, sob agitação

lenta e contínua. A mistura foi então centrifugada a 10.000 RPM por 30 segundos a 4°C. O sobrenadante obtido foi dializado por 24h em tampão Tris-HCl 0.02M (pH 8,1) com 2 trocas e a preparação obtida (cAg) foi avaliada quanto ao conteúdo proteico pelo método de Bradford, obtendo-se a concentração de 340 µg de proteína/mL. Após a determinação da concentração de proteínas, uma alíquota do antígeno foi analisada por SDS-PAGE (gel a 10%) com posterior coloração pela prata e outra transferida por meio de western-blotting para membranas de nitrocelulose para posterior realização de imunoblot com um “pool” de soros de pacientes com a forma juvenil e outro com soros de pacientes com a forma adulta da paracoccidiodomicose, para determinação das frações antigênicas reconhecidas por anticorpos (figura 3.1). Pode-se observar que a principal fração reconhecida pelos soros de ambas as formas clínicas da paracoccidiodomicose é a que apresenta peso molecular de aproximadamente 43 kDa (gp43) (figura 1 – linha C e D), e que o soro de pacientes com a FJ (linha C) apresenta anticorpos que reconhecem um maior número de bandas, com maior intensidade.



**Figura 3.1:** Análise por SDS-PAGE (B) e imunoblot (C e D) das frações protéicas do antígeno celular (cAg). Observa-se que a principal fração reconhecida por anticorpos de pacientes com a FJ (C) e com a FA (D) da paracoccidiodomicose é a que apresenta peso molecular de aproximadamente 43 kDa (C e D). A linha A é formada por um padrão de peso molecular.

### **3.4 Separação imunomagnética de subpopulações celulares a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)**

As células mononucleares foram separadas do sangue periférico (30 a 50 mL coletados por punção venosa em tubos contendo heparina sódica) por meio de gradiente de Ficoll-Hypaque. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de 15 mL contendo uma solução de Ficoll-hypaque (5 mL) e centrifugado a 400 g durante 30 minutos. A fração contendo as células mononucleares (CMSP) foi coletada e submetida a duas lavagens com PBS (300 g, por 10 minutos a 4°C). As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI e contadas em câmara de Neubauer. Para os experimentos realizados para avaliar a capacidade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> contra leveduras de *P. brasiliensis* e contra células-alvo, as CMSP foram estimuladas (2 x 10<sup>6</sup> células/mL de RPMI suplementado) com o antígeno celular (cAg) a 10 µg/mL por 5 dias em garrafas de cultura de células (75 cm<sup>2</sup>). Nos outros experimentos descritos foram utilizadas CMSP não estimuladas. Após o período de incubação as garrafas de cultura foram colocadas sobre gelo por 15 minutos e as células recuperadas por meio de várias lavagens com PBS gelado. Após centrifugação o número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e o isolamento das subpopulações celulares (células CD56<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>) foi realizado por meio de separação imunomagnética por marcação positiva. As CMSP foram ressuspensas em 15 mL de PBS-BSA(0,5%)-EDTA(2mM) (PBS-BSA-EDTA) estéril gelado e centrifugadas (300 g por 10 minutos a 4°C). Em seguida as células foram ressuspensas em 160 µL de PBS-BSA-EDTA gelado, acrescentando-se 40 µL da solução de anticorpos anti-CD56

acoplados a esferas metálicas (MACS, Miltenyi Biotec) e então incubadas por 15 minutos a 4°C. Após a incubação foi realizado uma lavagem acrescentando-se 2 mL de PBS-BSA-EDTA gelado seguido de centrifugação (300 g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi completamente retirado e as células foram ressuspendidas em 500 µL de PBS-BSA-EDTA gelado. A suspensão de células foi então passada através de coluna preenchida com malha metálica (colunas LS, Miltenyi Biotec), submetida a um campo magnético (MidiMACS, Miltenyi Biotec). As células não marcadas foram retiradas pela lavagem da coluna (ainda no magneto) com 9 mL de PBS-BSA-EDTA gelado (3 lavagens com 3 mL cada). Após a retirada das células não marcadas (seleção negativa), a coluna foi retirada do magneto e lavada com 9 mL de PBS-BSA-EDTA gelado para a retirada das células positivamente selecionadas (CD56<sup>+</sup>). A fração selecionada negativamente foi centrifugada e o processo de separação repetido com marcação para as células CD14<sup>+</sup> por meio da utilização de anticorpo específico. Após o processo de separação, as células selecionadas foram contadas em câmara de Neubauer sendo a viabilidade estimada por coloração com azul de tripan. As células obtidas foram avaliadas por meio de citometria de fluxo para determinar a pureza das populações, que variou de 90 a 98% (**ver resultado representativo no item 8.4 – figura 8.1 em “Apêndice”**).

### **3.5 Avaliação da atividade fungicida direta de células CD56<sup>+</sup> sobre leveduras de *P. brasiliensis***

Para a avaliação da atividade fungicida direta das células CD56<sup>+</sup> sobre leveduras de *P. brasiliensis*, as células obtidas conforme descrito no item anterior foram ressuspensas ( $2 \times 10^6$  células/mL) em meio RPMI suplementado (soro humano AB inativado a 10%, L-glutamina a 2mM e gentamicina a 5 µg/mL) e colocadas em placas de cultura de 96 cavidades com fundo em U ( $2 \times 10^5$  células/cavidade), juntamente com células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 (relação entre o número de leveduras:CD56<sup>+</sup> de 1:250) e incubadas em estufa a 37°C (CO<sub>2</sub> a 5% com atmosfera saturada por vapor d'água) por 48 horas. Para a avaliação da ação da IL-15 sobre a atividade citotóxica direta, em paralelo foram feitas coculturas nas mesmas condições descritas acima, adicionando-se IL-15 recombinante (R&D Systems) na concentração final de 5 ng/mL.

Após o período de cocultura, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante retirado cuidadosamente (armazenado a -80°C para determinar a produção de granulicina). As amostras foram então plaqueadas em meio BHI (suplementado com fator de crescimento obtido de culturas de *P. brasiliensis*, soro normal de cavalo e solução antibiótica penicilina/estreptomicina) e incubadas em estufa a 36°C. O número de CFUs foi determinado a partir do 5º até o 30º dia de cultura e então corrigido pelo fator de diluição e expresso em número de CFUs/mL.

### **3.6 Determinação da atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> (natural killer) sobre células alvo por meio da dosagem de liberação de cromo.**

Avaliamos a citotoxicidade das células CD56<sup>+</sup> contra células K562 (linhagem de células de origem mielóide), utilizando a técnica de liberação de cromo radioativo. Células da linhagem K562 mantidas em cultura e após confluência de 80% foram contadas e marcadas com cromato de sódio (Cr<sup>51</sup> - 481mBq/mL – IPEN/CENEM-SP). Para isso, após a contagem, as células K562 foram incubadas em meio contendo 20% de soro bovino fetal (SBF) e cromato de sódio por 75 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a incubação as células foram centrifugadas, e lavadas 3 vezes com 2 mL de meio RPMI suplementado. As células foram novamente contadas e o número de células calculado para serem utilizadas nas coculturas com células CD56<sup>+</sup> (isoladas por meio imunomagnético) em diferentes proporções de células NK para cada célula alvo (NK:Alvo = 60:1; 30:1; 15:1; 7,5:1; 3,3:1 e 1:1 – cada condição foi testada em triplicata). As células foram plaqueadas em placas com fundo em V (Limbro) em um volume final de 200 µL/cavidade, centrifugadas (5 minutos a 800 rpm a temperatura ambiente) e incubadas por 4 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Em cada placa foram incluídos os controles de liberação mínima (células alvo em meio RPMI sem adição de células CD56<sup>+</sup>) e de liberação máxima (células alvo lisadas com a adição do detergente Triton-X-100). Após a incubação a placa foi novamente centrifugada (2 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente), sendo retirado de cada cavidade 90 µl do sobrenadante, que foram transferidos para tubos apropriados. A leitura da liberação de cromo foi feita em contador gama



(Gama 55008 - Bekman). Após a leitura foi calculada a porcentagem de lise de células alvo, utilizando como parâmetros os dados de liberação mínima e máxima de cromo.

### **3.7 Determinação da atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> sobre células alvo (monócitos infectados com leveduras de *P. brasiliensis*) por meio da dosagem de LDH.**

Em um primeiro momento realizamos uma série de experimentos para demonstrar que células CD14<sup>+</sup> (monócitos) isolados do sangue periférico poderiam ser infectados por leveduras de *P. brasiliensis*. A demonstração da infecção foi feita pela utilização de leveduras marcadas com CFSE e análise por citometria de fluxo. A realização desses experimentos nos permitiu demonstrar que após 4 horas de cultura, um número significativo de células CD14<sup>+</sup> haviam sido infectadas, tanto por leveduras da cepa virulenta (Pb18) como por leveduras da cepa avirulenta (Pb265) do *P. brasiliensis* (**ver resultado representativo no item 8.5 - figuras 8.2 e 8.3 em “Apêndice”**).

Para a avaliação da resposta citotóxica de células “natural killer” (CD56<sup>+</sup>) sobre células alvo (CD14<sup>+</sup> infectadas) foi utilizado um “kit” comercial (Citotox 96, Promega Corporation, Madison WI, USA) para a dosagem de LDH (lactato desidrogenase). Após a separação magnética, a população de células CD14<sup>+</sup> foi ressuspensa em meio RPMI suplementado (soro humano AB inativado a 10%, L-glutamina a 2 mM e gentamicina a 5 µg/mL) em uma concentração de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL e incubadas por 4 horas em placas de 96 cavidades com fundo em U

( $2 \times 10^4$  células/cavidade) com leveduras das duas cepas de *P. brasiliensis* (razão de 1 célula para cada 50 leveduras). Após a incubação, a cada cavidade foram adicionadas então as células CD56<sup>+</sup> em diferentes concentrações ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células/cavidade) (**todas as condições foram analisadas em duplicata**), e o volume final acertado para 100  $\mu$ L por cavidade. Para a avaliação da ação da IL-15 sobre a atividade citotóxica, em paralelo foram feitas coculturas nas mesmas condições descritas acima, adicionando-se IL-15 recombinante (R&D Systems) na concentração final de 5 ng/mL. A placa foi então centrifugada (250 x g a 4°C por 4 minutos) para aumentar o contato entre as células e incubada por 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a incubação a placa foi novamente centrifugada (250 x g a 4°C por 4 minutos) e 50  $\mu$ L de cada sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 cavidades de fundo chato para a dosagem da liberação de LDH, conforme instruções do fabricante. A cada cavidade foram adicionados 50  $\mu$ L do substrato, reconstituído na hora do uso, e a reação foi incubada por 30 minutos protegida de luz. Após esse período a reação foi parada com a adição de 50  $\mu$ L do tampão de parada e as absorbâncias de cada cavidade foi avaliada em leitora de placas de ELISA (BioRad) a 490nm.

Conforme as instruções do fabricante, em cada placa foram incluídos os seguintes controles da reação (todos em duplicata): 1) **Liberação espontânea de LDH pelas células efetoras**: Células efetoras (CD56<sup>+</sup>) nas diferentes concentrações testadas ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células/cavidade); 2) **Liberação espontânea de LDH pelas células alvo**: células alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas pelas duas cepas de *P. brasiliensis*; 3) **Liberação máxima de LDH pelas células alvo**:

células alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas pelas duas cepas de *P. brasiliensis*, que foram lisadas com a adição de tampão de lise (10 µL) 45 minutos antes do final da incubação; 4) **Controle de correção de volume:** cavidade contendo meio de cultura, onde foram adicionados 10 µL do tampão de lise; 5) **“background” com meio de cultura:** cavidade contendo apenas meio de cultura suplementado (100 µL). 6) **Controle positivo:** cavidade contendo LDH extraído de coração bovino (provido com o “kit”). Das absorvâncias obtidas das amostras experimentais (coculturas) e dos controles de liberação espontânea de LDH pelas células efetoras e alvo, foram subtraídos os valores do controle de “background” e do controle de liberação máxima das células alvo foi subtraído os valores de absorvância obtido com o controle de correção de volume.

Após a leitura, a avaliação da % de lise em cada condição foi estimada com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ lise} = \frac{\text{Experimental} - \frac{\text{Liberação espontânea das células efetoras}}{\text{Liberação máxima das células alvo}} - \frac{\text{Liberação espontânea das células alvo}}{\text{Liberação espontânea das células alvo}}}{\text{Liberação máxima das células alvo} - \text{Liberação espontânea das células alvo}} \times 100$$

### 3.8 Avaliação da participação de grânulos na atividade fungicida direta e na resposta citotóxica contra células alvo.

Para determinar a importância dos componentes dos grânulos citotóxicos na atividade fungicida direta e na resposta citotóxica contra células alvo, após a separação das células CD56<sup>+</sup>, as mesmas foram submetidas a diferentes

tratamentos antes de serem colocadas em cultura (cloreto de estrôncio 25 mM – agente que causa desgranulação - por 18 horas; concanamicina A 10 nM - inibidor de ATPase de vacúolos, importante para manter a perforina nos grânulos - por 2 horas). Após o tratamento, as células foram coletadas e passaram por uma lavagem (PBS – 1250 RPM, por 10 minutos a 4°C) antes de serem utilizadas. O EGTA (quelante de cálcio – concentração final de 4 mM) foi adicionado no momento da cocultura.

Para verificar se os tratamentos acima são efetivos para a eliminação dos constituintes dos grânulos citotóxicos, fizemos alguns experimentos por meio de citometria de fluxo, com marcação intracelular de granzimas A e B (marcadas com FITC – BD Biosciences) e perforina (marcada com PE – BD Bioscience). Pudemos observar que o tratamento das células CD56<sup>+</sup> com SrCl<sub>2</sub>, leva à completa eliminação do conteúdo dos grânulos citotóxicos (perforina, granzima A e granzima B), enquanto que o tratamento com concanamicina A diminui somente a quantidade de perforina, não alterando de maneira significativa (embora haja leve diminuição) a porcentagem de células positivas para as granzimas A e B. O tratamento com EGTA (por 18 horas) não altera de maneira significativa a porcentagem de nenhum dos grânulos analisados (**ver item 8.6 – figura 8.4 em “Apêndice”**).

### **3.9 Citometria de fluxo**

Durante o desenvolvimento do projeto a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para a avaliação de diversos parâmetros nas diferentes populações celulares analisadas.

A avaliação da porcentagem de células NK no sangue periférico de pacientes e de indivíduos do grupo controle foi realizada a partir do sangue total após a lise das hemácias. Para isso, 0,5 mL de sangue coletado em tubos contendo heparina sódica foram incubados por 10 minutos com tampão de lise ( $\text{KHCO}_3$  – 10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 155 mM, EDTA – 0,1 mM) a temperatura ambiente. As células foram então centrifugadas e quando necessário (lise incompleta), submetidas a novo tratamento com tampão de lise (5 minutos a temperatura ambiente). Após a lise total das hemácias, as células foram lavadas com 2 mL de tampão de lavagem (PBS-BSA 1%- azida sódica 0,2 mM – PBS-BSA-A) e ressuspendidas em um volume de 500  $\mu\text{L}$  de tampão PBS-BSA-A. As células foram então distribuídas (50  $\mu\text{L}$ ) em tubos contendo uma mistura de anticorpos para marcação de superfície (anti-CD56 PercP-Cy5, anti-CD8-APC, anti-CD3-PE-Cy7 e anti-CD4-APC-Cy7). Após 20 minutos de incubação a 4°C no escuro, foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA-A centrifugando-se por 10 minutos a 1250 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas (vórtex), adicionando-se 120  $\mu\text{L}$  de tampão PBS-BSA-A, e centrifugando mais uma vez por 10 minutos a 1250 rpm a 4°C, o sobrenadante mais uma vez foi desprezado e as células ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  de formaldeído a 2%. A leitura foi realizada no máximo após 24 horas, conforme descrito abaixo.

As células  $\text{CD56}^+$  também foram avaliadas por citometria de fluxo para determinar a expressão de moléculas de superfície, grânulos citotóxicos e produção de  $\text{IFN-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$ , enquanto que as células  $\text{CD14}^+$  foram avaliadas para a expressão de moléculas de superfície. Após a separação imunomagnética,

as células CD56<sup>+</sup> foram cultivadas na presença ou ausência de IL-15 (5 ng/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265 – razão 1:100) por 24 horas. Nas últimas 6 horas de cultura foi adicionado brefeldina A (1 µg/mL) nas culturas para impedir a secreção de proteínas. As células CD14<sup>+</sup> foram estimuladas com as duas cepas de *P. brasiliensis* (Pb265 e Pb18 por 4 horas). Após o período de incubação as células foram coletadas, centrifugadas e ressuspendidas em tampão PBS-BSA-A. Após esse procedimento 20 µL da suspensão de células (aproximadamente 2 x 10<sup>5</sup> células) foram distribuídas em placas de 96 cavidades com fundo em U, contendo os anticorpos para a marcação de superfície: **Células CD56<sup>+</sup>**: anti-CD56 (PercP-Cy5 ou PE-Cy7), anti-CD16 (APC-Cy7), anti-NKG2D (APC), anti-CD69 (APC-Cy7), anti-CD25 (PE-Cy7), anti-KIR3 (FITC), anti-KIR2DL2/L3/S2 (PE), anti-CD8 (APC-Cy7 ou APC), anti-CD3 (PE-Cy7). E para as **células CD14<sup>+</sup>**: anti-CD14 (PE-Cy5), anti-MHC-I (FITC), anti-MHC-II (APC-Cy7), anti-CD80 (Alexa 647), anti-CD86 (FITC), anti-MICA/B (PE). Como controle da reação em cada experimento foram incluídos tubos contendo uma mistura de anticorpos inespecíficos (controles de isotipo) marcados com os mesmos fluorocromos. Após 20 minutos de incubação a 4°C no escuro, foram adicionados 120 µl de tampão PBS-BSA-A centrifugando-se por 10 minutos a 300 g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas (vórtex), adicionando-se 120 µl de tampão PBS-BSA-A, centrifugando-se mais uma vez por 10 minutos a 300 g a 4°C, o sobrenadante mais uma vez foi desprezado e a células ressuspendidas em 150 µl de formaldeído 2%. As células CD56<sup>+</sup> foram então incubadas por 20 minutos a 4°C no escuro. Para a marcação de moléculas

intracelulares, após a incubação, a placa foi novamente centrifugada (10 minutos a 300 g a 4°C), o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas e adicionado 150 µl de tampão PBS-BSA-A. Após a nova centrifugação, foram adicionados 120 µl de tampão de permeabilização (PBS-Saponina (0,5%) - PBS-S), misturando-se cuidadosamente e incubando-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram então adicionados os anticorpos anti-IFN- $\gamma$  (FITC), anti-TNF- $\alpha$  (PE), anti-Granzima A (PercP-Cy5), anti-Granzima B (FITC), anti-Perforina (APC), anti-Granulisina (PE) em 20 µl de tampão PBS-S, seguindo-se uma incubação de 30 minutos a 4°C no escuro. Após a incubação foram adicionados 150 µl de tampão PBS-S, seguido de centrifugação. As células foram ressuspensas novamente em tampão PBS-S e centrifugadas. A seguir foram adicionados 150 µl de tampão PBS-BSA-A e a placa centrifugada (10 minutos a 300 g a 4°C), as células foram então ressuspensas em 150 µl de formaldeído 2%.

Após o procedimento de marcação, as células foram transferidas para tubos apropriados e o volume (quando necessário) completado para 300 µL, as leituras foram feitas em citômetro de fluxo (FACScanto/Becton & Dickson). A análise dos resultados foi feita em programa específico (FSC Express, DeNovo Software, versão 3.00.0314), sendo analisada a porcentagem de células positivas e a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada parâmetro. As estratégias utilizadas para a análise dos diferentes parâmetros estão demonstradas **nos itens 8.7 – figura 8.5; 8.8 – figura 8.6 e 8.9 – figura 8.7 do “Apêndice”**.

### 3.10 Avaliação da expressão do RNA mensageiro

#### 3.10.1 Condições de cultura

Além da expressão de proteínas, analisamos também a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de diversos genes associados à atividade das células CD56<sup>+</sup> e a expressão do RNAm para IL-15 pelos monócitos (células CD14<sup>+</sup>).

Para avaliarmos o efeito da IL-15 e da exposição a leveduras de *P. brasiliensis* na expressão de diversos genes nas células CD56<sup>+</sup>, após a purificação as células foram mantidas sem estímulo adicional ou então estimuladas por 24 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (relação 1 célula leveduriforme para cada 100 células CD56<sup>+</sup>) e/ou IL-15 recombinante (5 ng/mL).

Para avaliar a expressão do RNAm para IL-15 por monócitos, utilizamos células CD14<sup>+</sup> (monócitos) purificadas por separação imunomagnética (conforme descrito acima). As células CD14<sup>+</sup> foram então mantidas sem estímulo adicional ou incubadas por 24 horas com células leveduriformes das cepas Pb18 ou Pb265 (relação de 1 célula fúngica para cada 50 células).

Após o período de incubação, as diferentes preparações celulares foram coletadas e as cavidades das placas foram lavadas com PBS-azida sódica [0,2 mM], para a completa remoção das células. As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e o “pellet” de células foi congelado (-80°C) imediatamente até o momento de uso.



### **3.10.2 Extração de RNA**

No momento da extração, 500  $\mu\text{L}$  de Trizol (Invitrogen) foram adicionados vagarosamente ao "pellet" de células sob agitação, procedendo-se a homogeneização até a completa dissolução do "pellet". Foi então adicionado 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, seguido de agitação (vortex) por 10 segundos. A solução foi então incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12000  $g$  a 4°C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo e foi adicionado igual volume de isopropanol ( $\pm 250 \mu\text{L}$ ) e 1,2  $\mu\text{L}$  de LPA (poliacrilamida linear – Ambion - 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) a cada tubo para atuar como carreador. A solução foi agitada (vortex) por 10 segundos e incubada a -20°C por 45 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 12000  $g$  a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente sendo adicionados 0,8 mL de etanol a 75% gelado. Os tubos foram centrifugados novamente por 10 minutos a 12000  $g$  à temperatura ambiente. O etanol foi removido e o "pellet" de RNA foi dissolvido em 35  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A quantidade de RNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro (Nanodrop 1000). A pureza do RNA obtido foi inferida pela razão entre as absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, que deveria estar próxima de 2.

### **3.10.3 Síntese de cDNA**

Antes da síntese do cDNA, as amostras de RNA obtidas foram submetidas ao tratamento com DNase para a remoção de possíveis cadeias de DNA

genômico que as estivessem contaminando. Para tanto, 1 µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,7 µL e foram acrescentados 4 µL do mix contendo 3 µL de tampão 10x concentrado e 1µL de DNase (Ambion). A seguir as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 minutos para a remoção do DNA. Após a incubação foram adicionados 0,3 µL de EDTA (0,5 M) a cada tubo, seguido de incubação a 75°C por 10 minutos para interrupção da atividade enzimática da DNase.

Para a síntese do cDNA, ao RNA tratado foi adicionado 0,5 µL de oligo dT<sub>16</sub> e 0,5 µL de “primers” randômicos (Applied Biosystems). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada rapidamente em gelo. A seguir foram adicionados 18 µL de um “mix” composto por: 10 µL de tampão de síntese; 2,5 µL de dNTP (10mM); 5 µL de DTT (0,1M); 0,25 µL de superscript R/T III (200U/µL- (Invitrogen)) e 0,25 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, e a seguir a 40°C por 50 minutos. A atividade enzimática foi interrompida incubando-se a 90°C por 5 minutos, seguido por incubação a 4°C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada rapidamente, adicionando-se 1 µL de RNase humana, incubando-se a 37°C por 20 minutos, para a remoção das moléculas restantes de RNA. A quantidade de cDNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro a 260/280 nm (Nanodrop 1000). Após a quantificação as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

### 3.10.4 Protocolo de qRT-PCR

O qRT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, California, USA) utilizando metodologia com corante intercalante SybrGreen. Em cavidades de placas de 100  $\mu$ L foram adicionados 3  $\mu$ L de cDNA (contendo 300 ng de cDNA) (ou de água no caso do controle negativo), 1  $\mu$ L do primer sense e 1  $\mu$ L do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 80 pM/reação (tabela I - previamente titulados, dados não mostrados) e 5  $\mu$ L do “master mix”, contendo dNTP, Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub>, SybrGreen, e tampão (Absolute SYBRGreen RT-PCR mix, Applied Biosystems). As amostras foram colocadas no aparelho de PCR em tempo real e submetidas a 40 ciclos de amplificação: 95°C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Para avaliar a especificidade dos primers utilizados, em cada reação foi elaborada uma curva de “melting” (aquecimento gradual da amostra amplificadas de 60°C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual é possível observar a dissociação dos produtos de amplificação **(ver item 8.10 - figura 8.9 em “Apêndice”)**. Os resultados foram analisados quanto à expressão do gene de interesse de cada amostra, utilizando como gene normalizador  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ M) e como amostra de referência o cDNA obtido a partir do RNA de CMSP (*ex vivo*) de um controle normal. Os resultados são expressos como concentração relativa calculada conforme descrito por Pfaffl (2001) [90] utilizando as eficiências de amplificação de cada “primer”, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct gene alvo}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct gene referência}}}$$

Onde  $E_{\text{gene alvo}}$  é a eficiência de amplificação da reação com o primer de interesse (p.e. eficiência do primer para Granzima A = 92,6);  $E_{\text{gene referência}}$  é a eficiência de amplificação da reação com o primer do gene normalizador ( $\beta_2\text{M} = 98,7$ );  $\Delta\text{Ct gene alvo}$  é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene de interesse (pool de células  $\text{CD56}^+$  ex vivo para o primer da granzima A) menos o Ct de amostra para o mesmo gene (p.e. célula  $\text{CD56}^+$  do paciente 1 estimulada com IL-15);  $\Delta\text{Ct gene referência}$  é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene normalizador (pool de células  $\text{CD56}^+$  ex vivo) menos o Ct de amostra para o mesmo gene (p.e. célula  $\text{CD56}^+$  do paciente 1 estimulada com IL-15).

**Tabela I:** Sequências dos “primers” utilizados no qRT-PCR.

“Primer”	Cadeia	Sequência (5' → 3')	Eficiência
$\beta_2M$	Sense	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	98,7%
	Anti-sense	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	
Granzima A	Sense	AAGAGTTTCCCTATCCATGCTATGA	92,6%
	Anti-sense	TTTGCTTTTTCCGTCAGCTGTA	
Granzima B	Sense	TGCAACCAATCCTGCTTCTG	90,0%
	Anti-sense	CGATGATCTCCCCTGCATCT	
Perforina	Sense	AAGCCCTCCGCCATTCTC	94,7%
	Anti-sense	AACAGCCTCTTGGCCTTCTG	
Granulisina	Sense	CTG AGC CCT CTC ACC TTG TC	94,6%
	Anti-sense	GGA GAG TGG ATT CTG GAT CG	
KIR3DL1	Sense	CCCACTGCTTGTCTGTCACA	101,3%
	Anti-sense	GGTACCAGATTTGGAGCTTGGT	
KIR2 (CD158b)	Sense	CTTCGGCTCTTCCGTGACT	93,2%
	Anti-sense	ACAGAAACAAGCAGTGGGTCA	
NKG2D	Sense	GAAGAGAGATCCTAAAGGCAATTCA	105,8%
	Anti-sense	CCCCAGCCCATCCA	
IFN- $\gamma$	Sense	CTAATTATTCGGTAACTGACTTGA	97,3%
	Anti-sense	ACAGTTCAGCCATCACTTGGGA	
IFN- $\alpha$	Sense	GGGATGAGGACCTCCTAGACAA	91,2%
	Anti-sense	CATCACACAGGCTTCCAAGTCA	
TNF- $\alpha$	Sense	TGGCCCAGGCAGTCAGA	95,6%
	Anti-sense	GGTTTGCTACAACATGGGCTACA	
IL-15	Sense	GTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGT	92,4%
	Anti-sense	CCTCACATTCTTGCATCCAGATTCT	

### 3.11 ELISA para detecção de granulisina no sobrenadante de cultura

A secreção de granulisina nas coculturas de células CD56<sup>+</sup> purificadas e leveduras de *P. brasiliensis* foi avaliada por meio de ELISA. Quando esse projeto foi elaborado, não existiam, pelo menos pelo nosso conhecimento, “kits” ou anticorpos específicos para esse fim disponíveis no mercado, embora alguns trabalhos já tivessem utilizado a técnica de ELISA para dosagem de granulisina no

soro/plasma de pacientes com tuberculose [91] [92]. Com base nesses trabalhos, desenvolvemos um método de ELISA que se mostrou satisfatório para a detecção de granulinsina em nossas amostras.

Para o desenvolvimento do ELISA, foram testadas diversas combinações de tampões (PBS, TBS) para cobertura, lavagem (acrescido ou não de Tween 20), diluição (BSA ou soro bovino fetal), bloqueio (BSA, soro bovino fetal, leite desnatado) e substrato (OPD e TMB). Assim como diferentes combinações de diferentes concentrações de anticorpos e reagentes secundários, com o intuito de evitar reações inespecíficas e ao mesmo tempo obter um teste capaz de detectar a granulinsina em nossas amostras (dados não mostrados).

Após essas padronizações chegamos ao seguinte protocolo: placas de alta afinidade (NUNC – Maxisorb) foram recobertas com 100  $\mu$ L/cavidade do anticorpo anti-grulinsina (Santa Cruz) diluído (1/5000) em tampão TBS (pH 7,2), e incubadas por uma noite a temperatura ambiente. Após a incubação a placa foi lavada com TBS por duas vezes, com intervalo de 30 segundos entre cada lavagem. As placas foram então bloqueadas com 300  $\mu$ L/cavidade de TBS-leite desnatado 5%, e incubadas por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas como descrito acima e foram adicionados 100  $\mu$ L do sobrenadante de cultura (em duplicata) e a placa foi incubada a 37°C por 90 minutos. Após a incubação e nova lavagem (4 vezes), foram adicionados 100  $\mu$ L de um outro anticorpo anti-grulinsina (“rabbit anti-human granulysin” - gentilmente cedido pelo Dr. A. M. Krensky, Stanford University, USA) diluído (1/5000) em TBS-BSA 0,1% e as placas foram incubadas por mais um período de 90 minutos a 37°C. Após a

lavagem (4 vezes) foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$ /cavidade de um anticorpo anti-IgG de coelho biotilado (Vector) diluído 1/1000 em TBS-BSA seguido de incubação (90 minutos a 37°C). Foi realizado nova lavagem (4 vezes) seguido da adição de estreptoavidina-peroxidase (100 $\mu\text{L}$ /cavidade - Sigma) diluída 1/1000 em TBS-BSA e incubação por 1 hora a 37°C. Após a incubação foi realizada uma última lavagem com TBS acrescido de Tween20 (0,05%), e adicionado 100  $\mu\text{L}$ /cavidade do substrato/cromógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ /TMB - Biolegend), incubando-se a temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi parada com a adição de 50  $\mu\text{L}$ /cavidade de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2N) e a leitura foi feita em leitora de ELISA (BioRad – modelo 680) a 450nm. Como não existe granulicina recombinante disponível no mercado para aquisição, a avaliação da quantidade de granulicina no sobrenadante foi feita de maneira relativa. Para isso em cada uma das placas de reação, foi adicionada (além do branco) uma amostra controle (sobrenadante de cultura de células  $\text{CD}56^+$  estimuladas por 48 horas com IL-15 recombinante). As médias de absorbância de cada uma das amostras de sobrenadante (após subtração da absorbância do branco) foram divididas pela média de absorbância da amostra controle (também subtraída do branco), sendo os resultados expressos então como quantidade relativa.

### **3.12 ELISA para detecção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ no sobrenadante de cultura**

Para dosagem de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura, foram realizadas culturas de 24 horas nas quais as células  $\text{CD}56^+$  purificadas foram cultivadas sem estímulo ou estimuladas com células leveduriformes de *P.*

*brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265), com IL-15 recombinante (5 ng/mL) e com IL-15 em conjunto com as duas cepas do fungo. Após a coleta do sobrenadante os mesmos foram submetidos à quantificação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por meio de ELISA (Kits duo set – R&D Systems), conforme as instruções do fabricante.

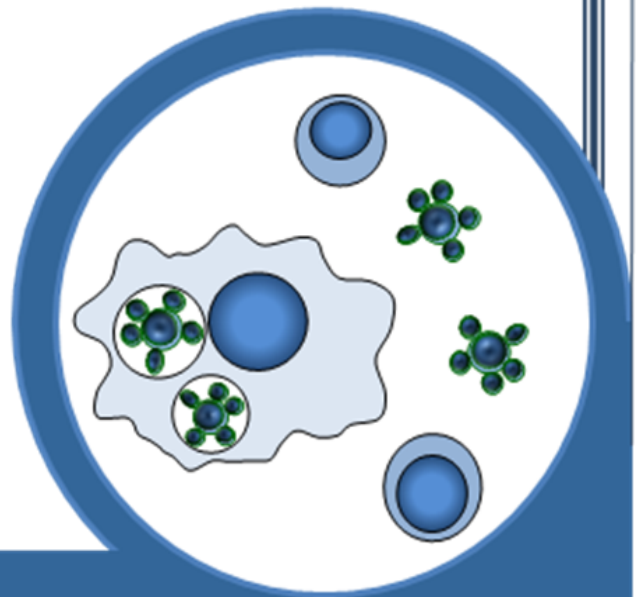
### **3.13 Análise estatística**

Os resultados foram analisados por meio de software SigmaStat v1.0 (Jandel Corporation). Os diversos grupos foram comparados por meio do teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni (3 ou mais grupos) ou com o teste *t* de “student” (dois grupos). A comparação entre amostras sem e com estímulo foi feita pelo teste de *t* pareado (dois grupos) ou ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni (3 ou mais grupos). Foram considerados significantes valores de  $p \leq 0,05$ .





# *Resultados*



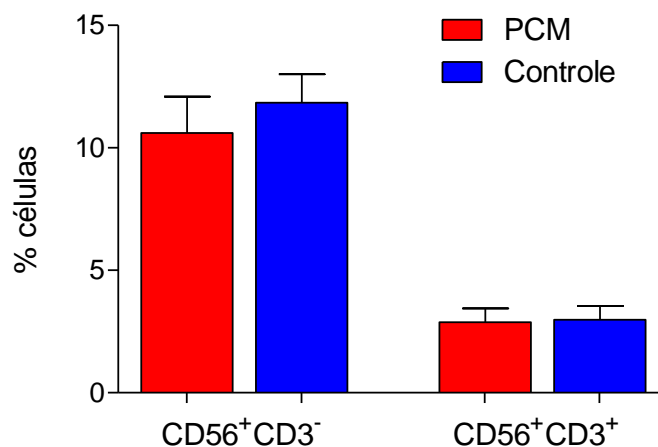


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pacientes com paracoccidiodomicose e controles apresentam a mesma porcentagem de células CD56<sup>+</sup> no sangue periférico, mas a atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose é menor do que de indivíduos do grupo controle.

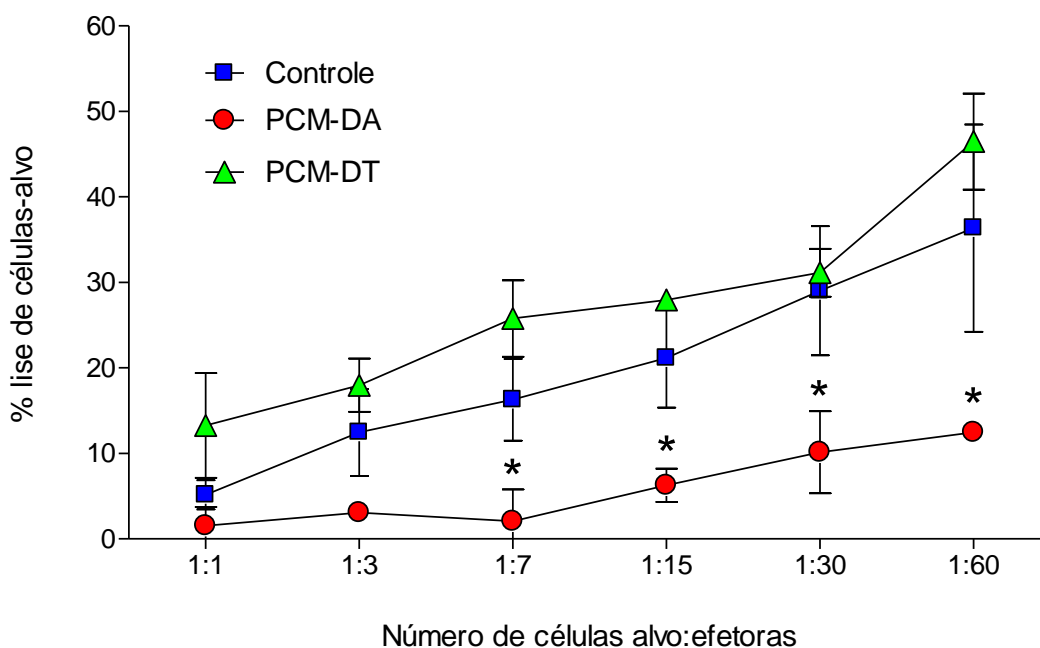
Em estudo publicado anteriormente [80] foi descrito que pacientes com paracoccidiodomicose ativa apresentam um maior número de células NK na circulação, mas com menor capacidade citotóxica contra células alvo. Para confirmar esses dados e avaliar a capacidade citotóxica de células NK de indivíduos apresentando paracoccidiodomicose ativa (PCM-DA), tratados (PCM-DT) e de controles normais, realizamos alguns experimentos utilizando como células alvo células K562, uma linhagem de células de origem mielóide rotineiramente utilizada para esse fim, uma vez que não expressam MHC de classe I.

Os nossos resultados não permitiram confirmar os dados referentes ao número de células, que como pode ser observado na figura 4.1 são similares nos pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) e indivíduos do grupo controle, tanto em relação às células NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), quanto em relação às células NKT (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) (figura 4.1).



**Figura 4.1:** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (células NK) e CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (células NKT) no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM – n=10) e indivíduos do grupo controle (n=13). Valores expressos como porcentagem de células positivas.

Entretanto, em relação à atividade citotóxica, os resultados obtidos demonstraram que células de pacientes com paracoccidiodomicose ativa apresentam uma diminuição significativa na capacidade citotóxica, comparadas as células obtidas de indivíduos saudáveis (figura 4.2). É interessante notar que após o tratamento antifúngico efetivo, a capacidade citotóxica das células CD56<sup>+</sup> de pacientes apresenta-se em níveis comparáveis aos de indivíduos do grupo controle (figura 4.2).



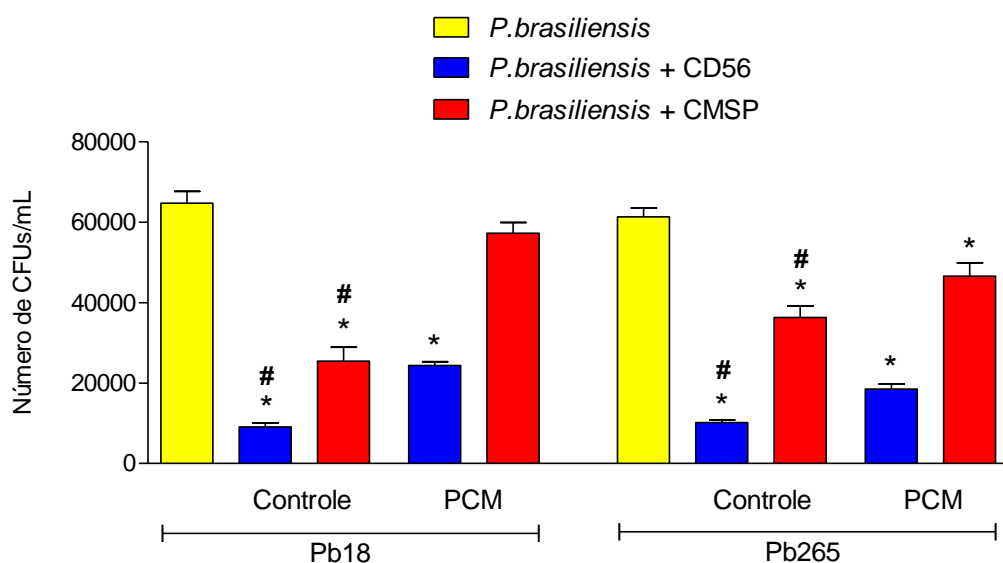
**Figura 4.2:** Análise da capacidade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> isoladas de controles (n=5), e pacientes com paracoccidiodomicose apresentando a doença ativa (PCM-DA – n=5) e após o tratamento antifúngico (PCM-DT – n=5). Como célula-alvo foi utilizada a linhagem celular K562, marcada com cromo e um número variável de células CD56<sup>+</sup> como células efetoras. Após 4 horas de cocultura, o sobrenadante foi coletado sendo realizada a leitura da emissão de radiação gama. Os resultados estão expressos como % de lise de células-alvo utilizando-se como referência a liberação espontânea de cromo pelas células alvo (mínimo) e a liberação máxima de cromo dada pela lise das células-alvo com detergente (triton-X-100). Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni, \* p≤0,05 em relação aos indivíduos do grupo controle e do grupo de pacientes com paracoccidiodomicose tratada (PCM-DT).

#### 4.2 A atividade fungicida direta de células CD56<sup>+</sup> difere entre os grupos analisados.

Para avaliar a capacidade citotóxica direta das células CD56<sup>+</sup> frente às duas cepas de *P. brasiliensis* foram realizados experimentos utilizando células de 10 indivíduos do grupo controle (C) e de 7 indivíduos apresentando a FA da paracoccidiodomicose e 3 apresentando a FJ (reunidos em um grupo denominado

PCM). Os resultados foram expressos como CFU/mL de sobrenadante das coculturas com as duas cepas de *P. brasiliensis* (figura 4.3). Tanto no grupo de indivíduos controle como no de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM) as células CD56<sup>+</sup> foram capazes de diminuir significativamente o número de CFUs de ambas as cepas testadas (Figura 4.3). As CMSP do grupo controle apresentaram atividade citotóxica direta contra as duas cepas de *P. brasiliensis*, enquanto que as de pacientes com paracoccidioidomicose foram efetivas somente contra a cepa avirulenta (Pb265) (figura 4.3).

Em relação aos grupos de indivíduos analisados, observamos que o grupo controle apresenta a maior capacidade fungicida frente às leveduras de ambas as cepas analisadas (figura 4.3). Essa capacidade foi maior independente da preparação celular utilizada. Em relação às duas cepas, podemos observar que a cepa Pb265 foi mais suscetível à atividade fungicida de praticamente todas as preparações de células utilizadas.



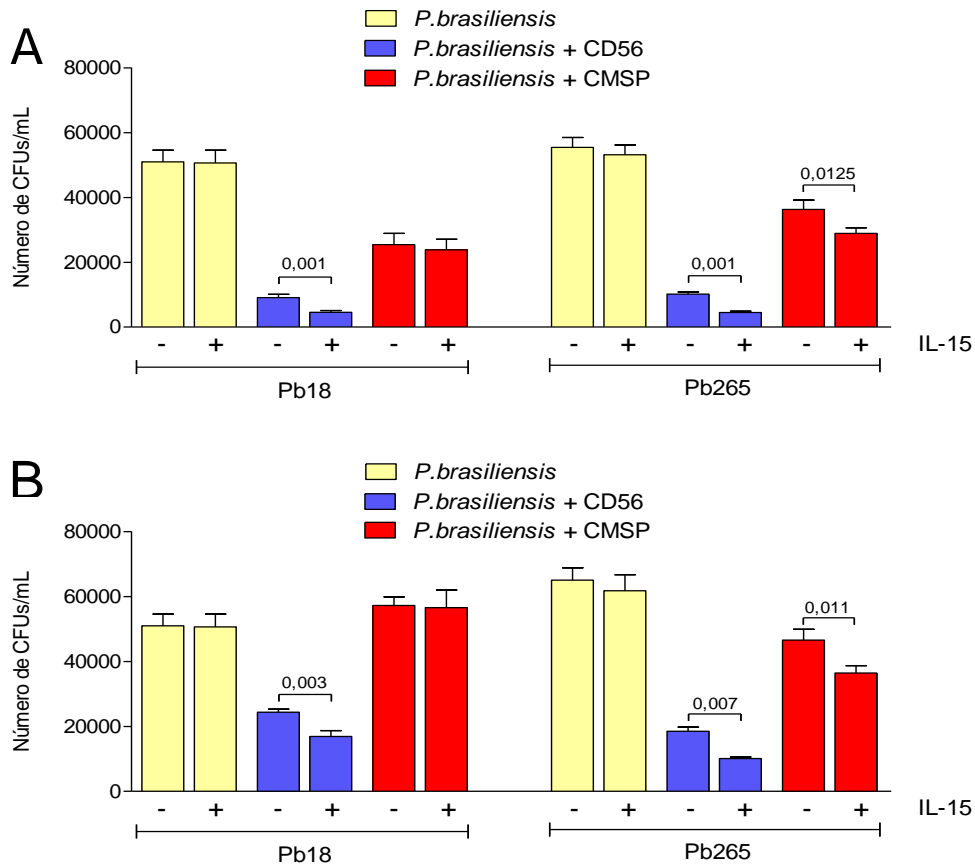
**Figura 4.3 (página anterior):** Número de CFUs / mL de sobrenadante obtidas após coculturas (48 horas) de células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis* (relação leveduras:células de 1:250) e células CD56<sup>+</sup> e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos do grupo controle (n=10) e com a forma adulta e juvenil da paracoccidiodomicose (PCM – n=10). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Bonferroni, \* p≤0,05 em relação às culturas de Pb18/Pb265 sem adição de células. Teste *t*: # p≤0,05 em relação às mesmas populações de células dos indivíduos com paracoccidiodomicose (PCM).

### **4.3 A adição de IL-15 nas coculturas aumenta a atividade fungicida de células CD56<sup>+</sup>.**

Na figura 4.4 está demonstrada a atividade fungicida direta das diferentes populações celulares após a adição de IL-15 nas coculturas. Pudemos observar que em relação à cepa Pb18 (figura 4.4 – lado esquerdo) a adição de IL-15 aumentou significativamente a atividade fungicida das células CD56<sup>+</sup> nos grupos controle (4.4A) e PCM (4.4B), embora não tenha tido efeito sobre a capacidade fungicida das CMSP.

Em relação à cepa Pb265 (figuras 4.4 – lado direito), a adição de IL-15 aumentou a atividade fungicida tanto das células CD56<sup>+</sup> purificadas quanto das CMSP nos dois grupos analisados, apesar do aumento ser mais acentuado nas células CD56<sup>+</sup>.





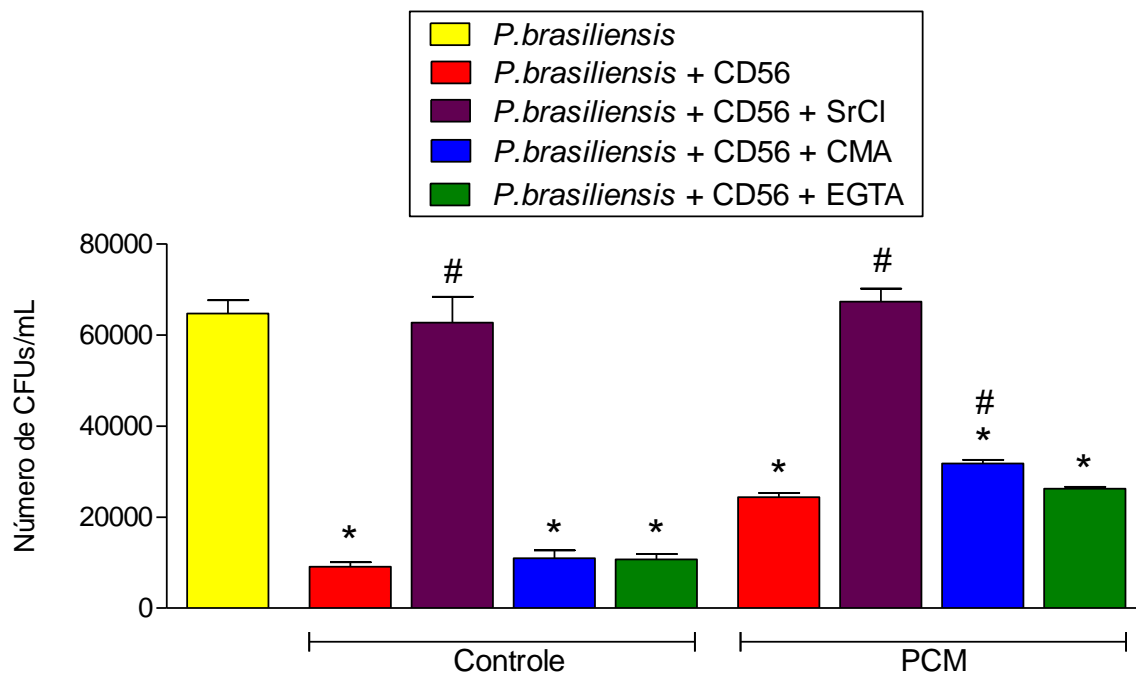
**Figura 4.4:** Número de CFUs / mL de sobrenadante obtidas após coculturas (48 horas na presença (+) ou ausência (-) de IL-15) de células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis* (relação leveduras:células de 1:250) e diferentes populações celulares (CD56<sup>+</sup> e células mononucleares do sangue periférico (CMSP)), de controles normais (**A** – n=9) ou com paracoccidiodomycose ativa (**B** - n=8). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: teste *t* pareado, os valores de *p* estão representados nos gráficos.

#### 4.4 A atividade fungicida direta de células CD56<sup>+</sup> é dependente de grânulos, mas é independente de perforina.

Para avaliar se a atividade fungicida direta das células CD56<sup>+</sup> é dependente de grânulos e mais especificamente dependente de perforina, realizamos experimentos avaliando o número de CFUs obtidos após a cocultura das células CD56<sup>+</sup> sem tratamento ou submetidas ao tratamento com cloreto de estrôncio (SrCl – agente que causa a liberação do conteúdo de todos os grânulos das

células – 25mM por 18 horas), concanamicina A (CMA - inibidor de ATPase de vacúolos, importante para manter a perforina nos grânulos – 10nM por 2 horas) ou EGTA (quelante de cálcio e portanto inibidor da polimerização de perforina - 4 mM adicionado no momento da cocultura). Os experimentos foram realizados utilizando-se células de indivíduos do grupo controle e de pacientes com PCM ativa, e contra células leveduriformes da cepa Pb18 (devido à pequena quantidade de células obtidas após a separação e ao grande número de condições, fato que impossibilitou a realização de experimentos com as duas cepas do fungo).

Como pode ser observado na figura 4.5, o tratamento com SrCl eliminou a capacidade fungicida das populações de células CD56<sup>+</sup> dos dois grupos analisados, demonstrando a importância dos grânulos para essa atividade. Quando se adicionou os reagentes que agem especificamente inibindo a perforina (CMA e EGTA), a atividade citotóxica foi similar ou então levemente diminuída em relação às células não tratadas, indicando que a perforina não é importante para esse fenômeno.

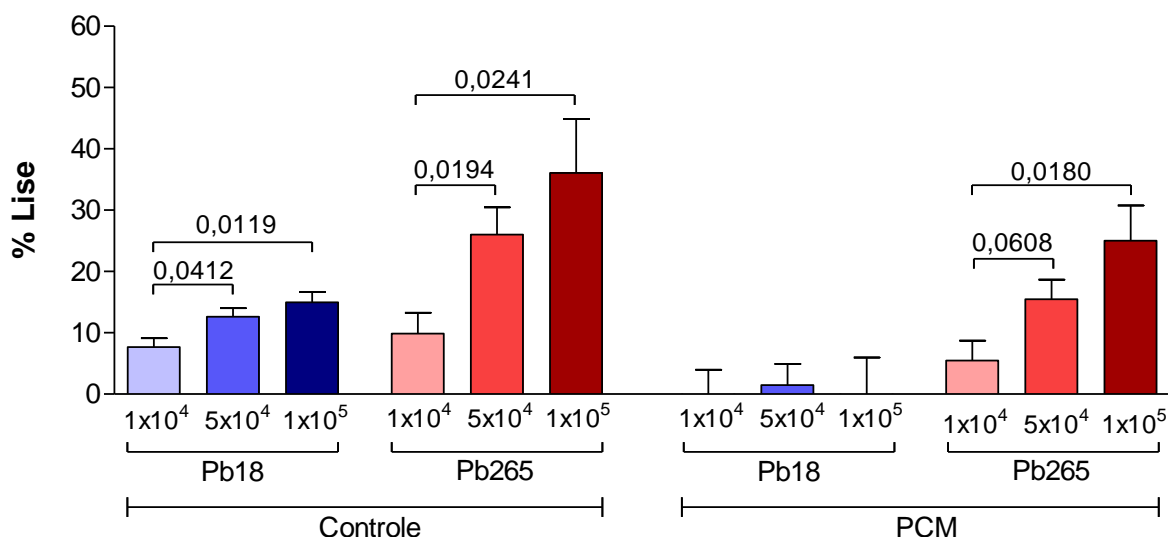


**Figura 4.5:** Número de CFUs / mL de sobrenadante obtidas após coculturas (48 horas) de células leveduriformes da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* (relação leveduras:células de 1:250) e células CD56<sup>+</sup> de controles normais (n=5) e com a paracoccidiodomicose ativa (n=5), sem tratamento ou após tratamento com cloreto de estrôncio (SrCl – 25mM por 18 horas); concanamomicina A (CMA - 10nM por 2 horas) ou EGTA (4mM adicionado no momento da cocultura). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: teste *t* pareado, \* p≤0,05 em relação ao número de CFUs obtido de leveduras cultivadas sem a presença de células; # p≤0,05 em relação ao número de CFUs de células sem tratamento.

#### 4.5 Atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> contra células-alvo apresenta padrão “dose-dependente” e é maior nos indivíduos controle.

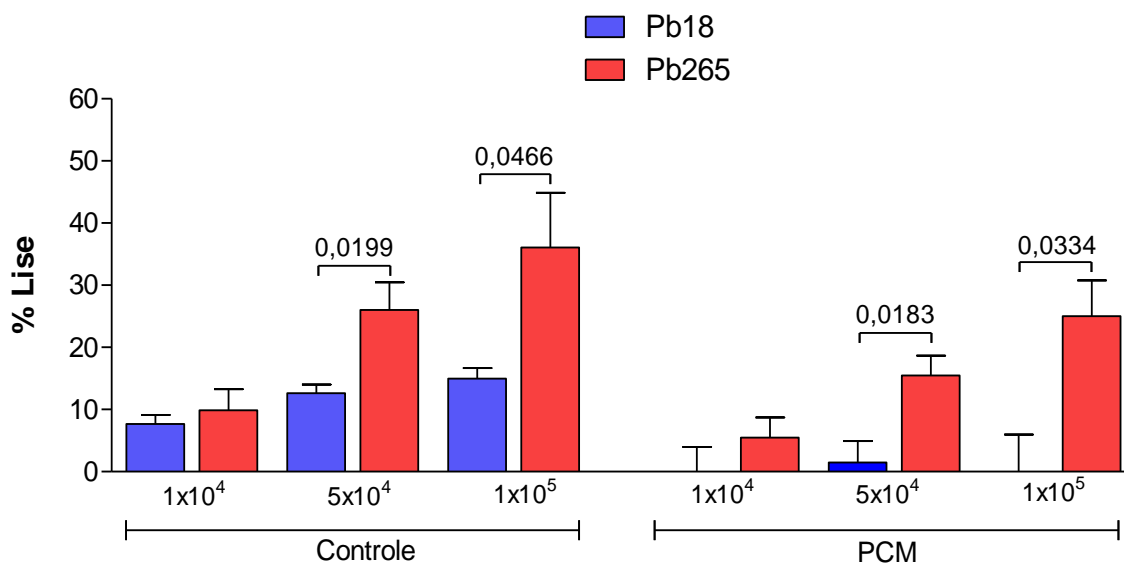
Para avaliarmos a atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> sobre células-alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas com as duas cepas de *P. brasiliensis*, testamos diferentes concentrações de células nas coculturas (1 x 10<sup>4</sup>, 5 x 10<sup>4</sup> e 1 x 10<sup>5</sup> células/cavidade). Como pode ser observado na figura 4.6, a atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> apresentou um comportamento “dose-dependente” quando analisamos as células de indivíduos controle frente a células-alvo infectadas com

ambas as cepas e de pacientes com paracoccidiodomicose ativa frente a células alvo infectadas com a cepa Pb265 (figura 4.6).



**Figura 4.6:** Avaliação da atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> de indivíduos controle (n=5) e pacientes com as formas adulta ou juvenil da paracoccidiodomicose (PCM – n=5) contra células alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas com células fúngicas da cepa Pb18 ou Pb265. As células alvo ( $2 \times 10^4$  células /cavidade) foram infectadas com leveduras (razão de 50 fungos para 1 célula) por 4 horas e depois incubadas com diferentes números de células efectoras (CD56<sup>+</sup>) ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células/cavidade) por 4 horas. Após a incubação os sobrenadantes foram testados para a presença de LDH (lactato desidrogenase) e o resultados transformados em % de lise. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste estatístico: ANOVA para amostra repetidas com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão destacados nos gráficos.

As células infectadas com a cepa Pb265 foram mais suscetíveis à lise do que as células infectadas com a cepa Pb18 (figura 4.7).



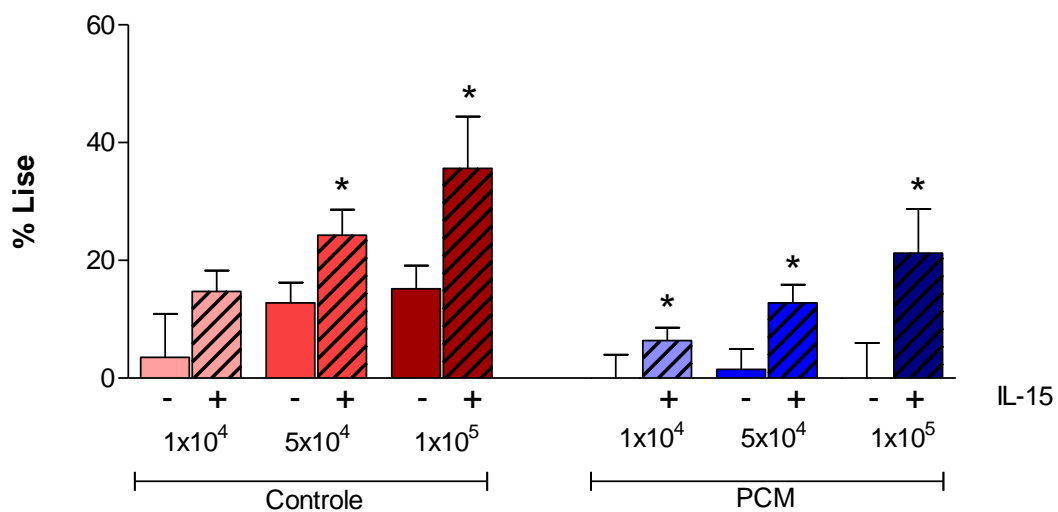
**Figura 4.7:** Avaliação da atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> de indivíduos controle (n=5) e pacientes com as formas adulta ou juvenil da paracoccidiodomicose (PCM – n=5) contra células alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas com células fúngicas da cepa Pb18 ou Pb265. As células alvo (2 x 10<sup>4</sup> células /cavidade) foram infectadas com leveduras (razão de 50 fungos para 1 célula) por 4 horas e depois incubadas com diferentes números de células efetoras (CD56<sup>+</sup>) (1x10<sup>4</sup>, 5x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>5</sup> células/cavidade) por 4 horas. Após a incubação os sobrenadantes foram testados para a presença de LDH (lactato desidrogenase) e os resultados transformados em % de lise. Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: *Teste t*, os valores de *p* estão destacados nos gráficos.

#### 4.6 A atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> contra células-alvo é influenciada positivamente pela presença de IL-15.

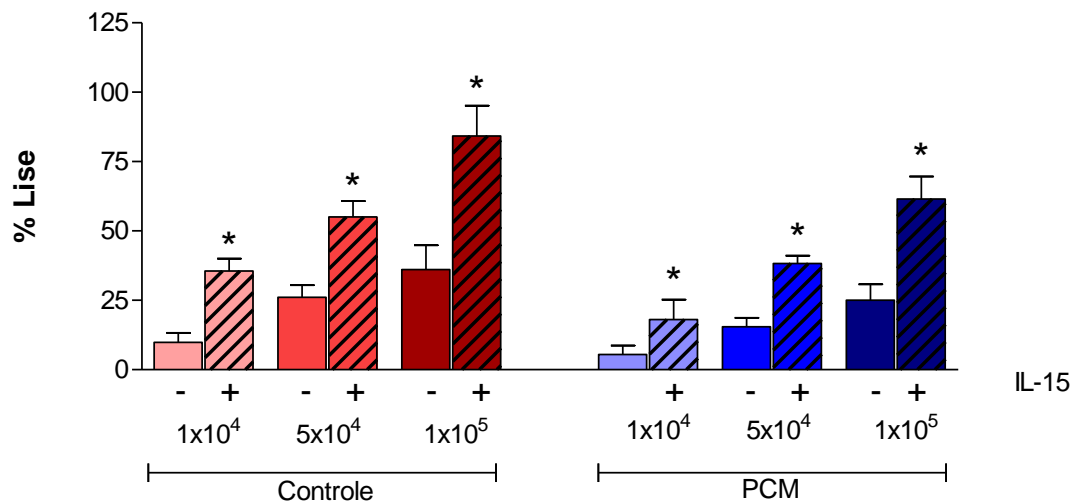
A adição de IL-15 nas coculturas de células demonstrou que essa citocina é capaz de aumentar a atividade citotóxica contra células-alvo de células CD56<sup>+</sup> (figura 4.8). Pudemos observar que quando as células-alvo foram infectadas com a cepa Pb18 (figura 4.8A), a IL-15 foi capaz de aumentar a atividade citotóxica das

células de indivíduos controle e de pacientes com a doença ativa, principalmente quando se utilizou o maior número de células efetoras ( $1 \times 10^5$ /cavidade). A capacidade citotóxica, que já era maior em relação às células infectadas por leveduras da cepa Pb265 do que da cepa Pb18, também foi significativamente incrementada pela adição de IL-15 às culturas, tanto no grupo controle como nos pacientes com doença ativa (Fig 4.8B).

### A – Pb18



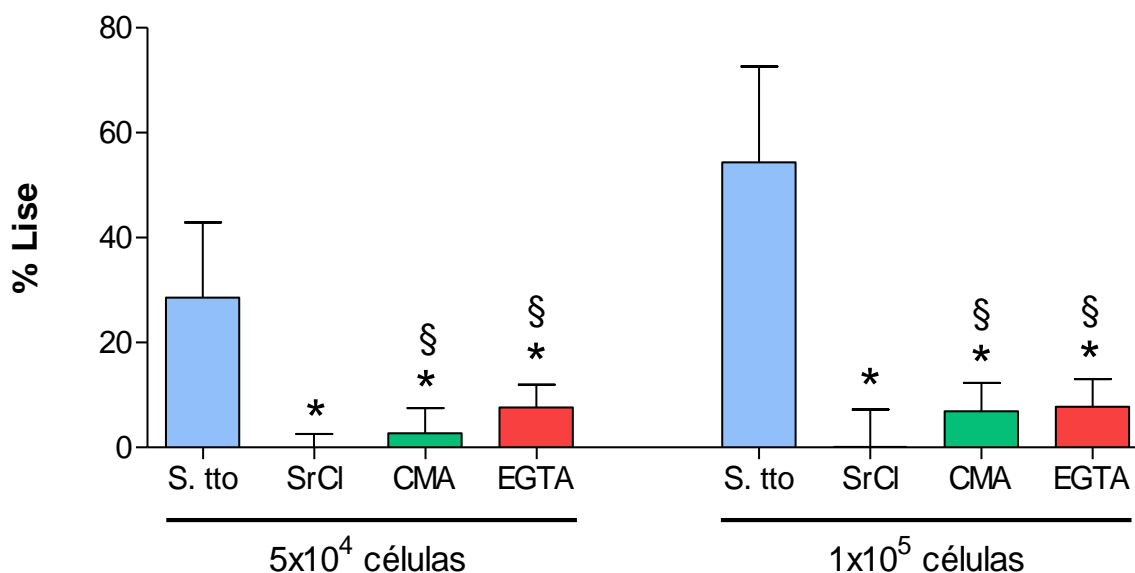
### B – Pb265



**Figura 4.8 (página anterior):** Avaliação da atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> de indivíduos controle (C – n=5) e pacientes com as formas adulta ou juvenil da paracoccidiodomicose (PCM – n=5) contra células alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas com células fúngicas da cepa Pb18 (A) ou Pb265 (B), na presença (+) ou ausência (-) de IL-15 (5 ng/mL). As células alvo (2 x 10<sup>4</sup> células /cavidade) foram infectadas com leveduras (razão de 50 fungos para 1 célula) por 4 horas e depois incubadas com diferentes números de células efetoras (CD56<sup>+</sup>) (1x10<sup>4</sup>, 5x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>5</sup> células/cavidade) por 4 horas. Após a incubação os sobrenadantes foram testados para a presença de LDH (lactato desidrogenase) e os resultados transformados em % de lise. Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: Teste *t* pareado, \* p≤0,05 em relação às células não tratadas com IL15.

#### **4.7 A atividade citotóxica de células CD56<sup>+</sup> contra células-alvo é dependente de grânulos e da perforina.**

Para avaliar se a citotoxicidade de células CD56<sup>+</sup> contra células-alvo depende de grânulos, fizemos experimentos utilizando células de indivíduos controle nas concentrações de células que apresentaram a melhor resposta nos experimentos anteriores, e somente contra células alvo infectadas com a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18). Como pode ser observado na figura 4.9, as células CD56<sup>+</sup> são dependentes de grânulos para exercerem a função citotóxica. Em relação à dependência de perforina, ao contrário dos resultados obtidos quanto à atividade fungicida direta, o tratamento das células com inibidores de perforina (CMA e EGTA) também demonstraram efeito supressor da resposta de lise (embora de maneira menos evidente do que quando comparado ao efeito do tratamento com SrCl). Esses resultados indicam que a presença de grânulos é essencial para a atividade citotóxica contra células-alvo, sendo essa atividade dependente (embora não totalmente) da presença de perforina.



**Figura 4.9:** Avaliação da atividade citotóxica de CD56<sup>+</sup> de controles normais (n=5) contra células alvo (CD14<sup>+</sup>) infectadas com células fúngicas da cepa Pb18. As células alvo (2 x 10<sup>4</sup> células /cavidade) foram infectadas com leveduras (razão de 50 fungos para 1 célula) por 4 horas e depois incubadas com diferentes números de células efetoras (CD56<sup>+</sup> - 5x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>5</sup> células/cavidade) não tratadas ou tratadas com cloreto de estrôncio (SrCl – 25mM por 18 horas); concanamicina A (CMA - 10nM por 2 horas) ou EGTA (4mM adicionado no momento da cocultura) por 4 horas. Após a incubação os sobrenadantes foram testados para a presença de LDH (lactato desidrogenase) e os resultados transformados em % de lise. Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: Teste *t* pareado, \* p<0,05 em relação às células sem tratamento; § p<0,05 em relação às células tratadas com SrCl.

#### 4.8 Células CD56<sup>+</sup> estimuladas com leveduras de *P.brasiliensis* e IL-15 aumentam a expressão do RNAm para os constituintes dos grânulos citotóxicos.

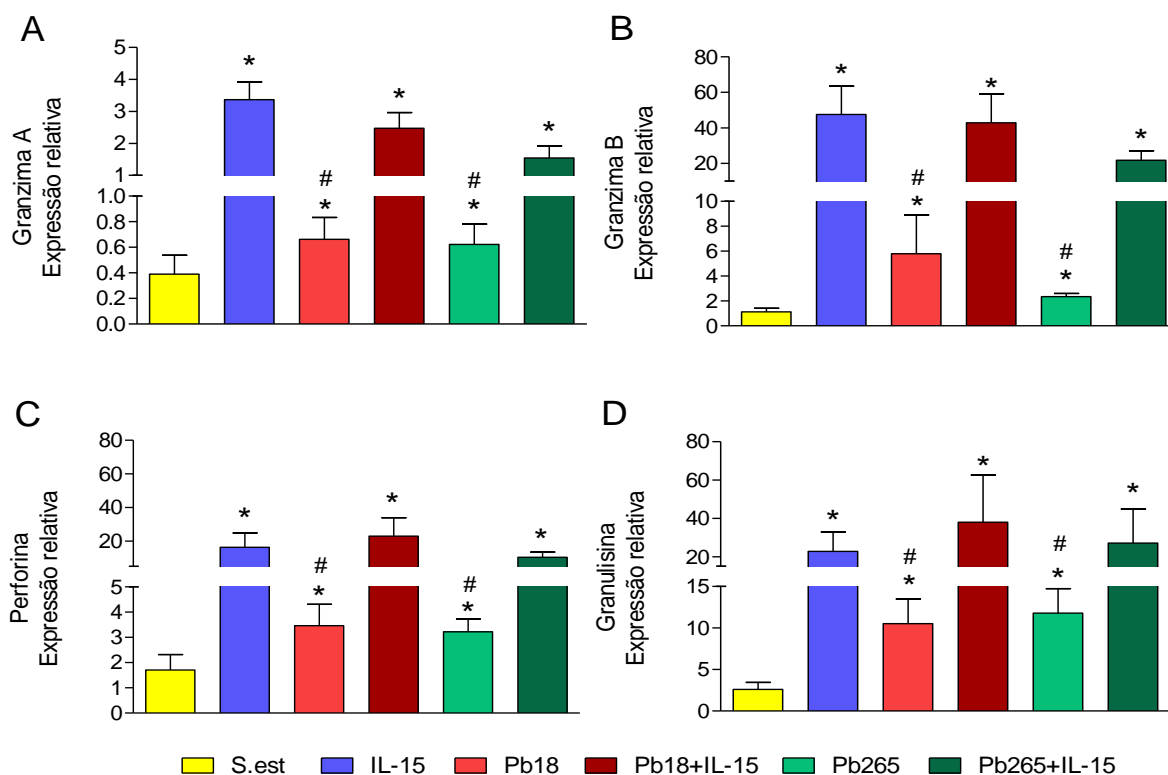
Como pode ser observado nos resultados descritos nos itens anteriores, tanto a citotoxicidade direta contra leveduras de *P. brasiliensis*, como a citotoxicidade contra células-alvo dependem dos constituintes dos grânulos



citotóxicos, e que essa atividade aumenta com a presença de IL-15. Para avaliar se a exposição às leveduras e o estímulo com IL-15 altera a expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos (Granzima A, Granzima B, Perforina e Granulisina) em um primeiro momento decidimos avaliar a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para essas moléculas em cultura de células CD56<sup>+</sup> provenientes de indivíduos do grupo controle.

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.10) a exposição das células CD56<sup>+</sup> às leveduras de *P. brasiliensis* leva a um aumento significativo nos níveis de expressão do RNAm de todas as moléculas analisadas (granzimas A e B, perforina e granulisina), não havendo diferenças significativas em relação às duas cepas. Também pudemos observar que o estímulo com IL-15 leva a um aumento bastante importante na expressão de todos os constituintes dos grânulos; não havendo, contudo, efeito aditivo na expressão quando combinados os estímulos de IL-15 e leveduras.

É interessante notar que embora estatisticamente significativo, o aumento da expressão do RNAm para granzima A foi pequeno quando comparado ao aumento observado para as outras moléculas (figura 4.10A).



**Figura 4.10:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para granzima A (A), granzima B (B), perforina (C) e granulinsina (D) em células CD56<sup>+</sup> isoladas do sangue de indivíduos do grupo controle (n=9) estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Resultados expressos como média ± EPM da expressão relativa determinado como descrito no item 3.10.4 em material e métodos. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.); #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL-15 recombinante.

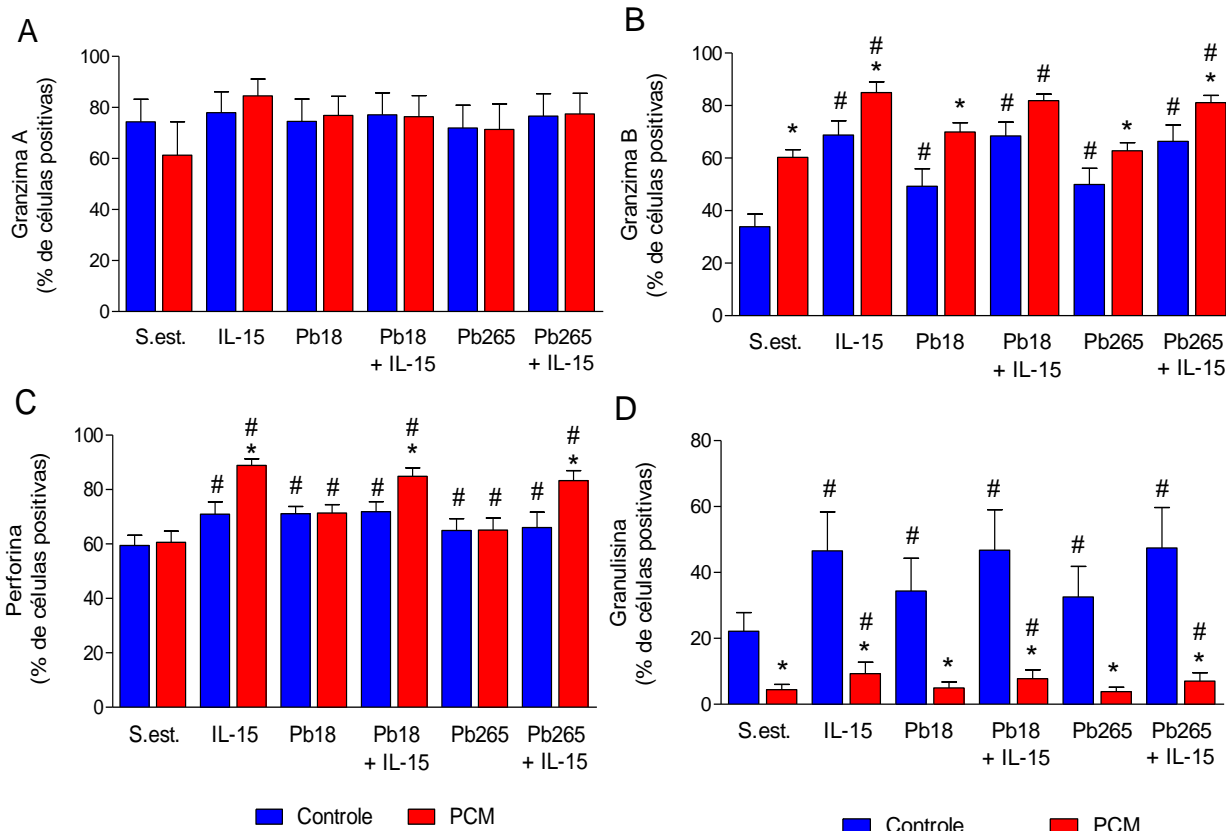
#### 4.9 Células CD56<sup>+</sup> de pacientes e de indivíduos controle estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* e IL-15 diferem quanto à produção dos constituintes dos grânulos citotóxicos.

Para confirmar os dados relativos à expressão do RNAm, analisamos a expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos por citometria de fluxo após o estímulo das células CD56<sup>+</sup> com leveduras de *P. brasiliensis* e IL-15

recombinante. A análise por citometria de fluxo demonstrou que as duas populações de células CD56<sup>+</sup> (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>), apresentam diferenças quanto a expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos. Enquanto que a granzima A e a granulisina são produzidas pelas duas populações, a perforina e a granzima B são produzidos quase que exclusivamente por células com baixa expressão de CD56 (CD56<sup>dim</sup>). Após o estímulo, notadamente com IL-15, as células CD56<sup>bright</sup> (alta expressão de CD56) também passam a produzir essas moléculas (com exceção da perforina) (**ver “dot-plots” representativos no item 8.11 – figuras 8.10, 8.11 e 8.12 do “Apêndice”**). Por esse motivo os gráficos abaixo representam os resultados obtidos na população de CD56 total (CD56<sup>dim</sup> + CD56<sup>bright</sup>).

Além disso, pudemos observar que existem diferenças quanto à expressão de granzima B, perforina e granulisina quando comparamos células de pacientes e de indivíduos do grupo controle. E que os estímulos com leveduras e com IL-15 levam ao aumento da porcentagem de células positivas para todos os constituintes analisados, com exceção da granzima A (Fig 4.11)

Células de pacientes com paracoccidiodomicose apresentaram uma maior expressão de granzima B e perforina (figura 4.11B e C respectivamente) do que células provenientes de indivíduos do grupo controle. Ao contrário, observamos uma maior expressão de granulisina nas células provenientes de indivíduos do grupo controle quando comparadas às células de pacientes (figura 4.11D).



**Figura 4.11:** Análise por citometria de fluxo da porcentagem em células CD56<sup>+</sup> que expressam granzima A (A), granzima B (B), perforina (C) e granulinsina (D). As células foram isoladas do sangue de indivíduos do grupo controle (n=10) e de pacientes com paracoccidiodomicose (n=8), não estimuladas (S.est.) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Os dados representam a média ± EPM da porcentagem de células positivas para cada parâmetro. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos controle submetidos às mesmas condições; #  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).

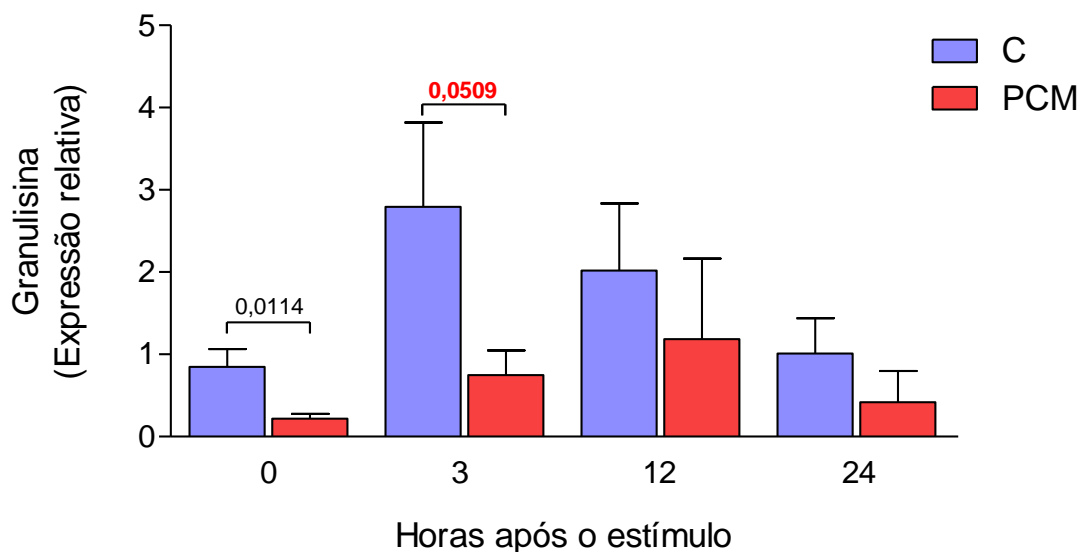
Assim como observado na expressão do RNAm, a combinação de leveduras (de ambas as cepas) e IL-15 não apresentou efeito adicional àquele observado com o uso de IL-15 isoladamente.

#### **4.10 Células de pacientes com paracoccidiodomicose ativa expressam menor quantidade do RNAm para granulicina do que células de controles normais.**

Como demonstrado nos itens anteriores, o efeito citotóxico de células CD56<sup>+</sup> sobre células leveduriformes de *P. brasiliensis* aparentemente depende de grânulos, mas é independente de perforina. Os principais componentes dos grânulos citotóxicos, além da perforina, são as granzimas (A e B principalmente) e a granulicina. Pudemos notar que células provenientes de indivíduos do grupo controle expressam quantidades muito superiores de granulicina do que células de pacientes com paracoccidiodomicose (figura 4.11D). A granulicina já foi relatada em outros trabalhos como sendo efetiva na morte de uma série de patógenos como o *M. tuberculosis*, *M. leprae*, o *C. neoformans* e a *C. albicans* [56, 58, 93]. Por esse motivo decidimos investigar se haveria diferença na cinética de expressão do RNAm para essa molécula, que pudesse explicar as diferenças encontradas em relação à diferença na expressão da proteína no dois grupos de indivíduos analisados.

Como os testes para análise do RNAm requerem um número considerável de células para ser realizado, decidimos investigar a cinética de expressão da granulicina em CMSP. Para isso, utilizamos CMSP não estimuladas ou estimuladas com a cepa virulenta do fungo (Pb18) por 3, 12 e 24 horas. Como pode ser observado na figura 4.12, em células *ex vivo* houve uma maior expressão do gene para granulicina nas células dos indivíduos controle (C) em relação às células de pacientes com as formas adulta ou juvenil da

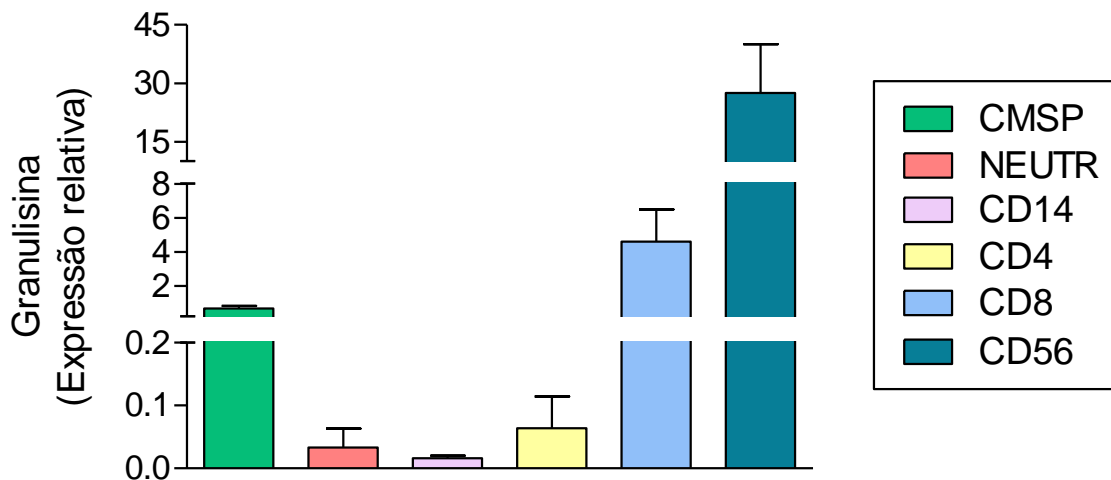
paracoccidioidomicose (reunidos em um único grupo - PCM). Após 3 horas de estímulo, as células de indivíduos controle ainda apresentavam uma maior produção, sendo que após 12 e 24 horas a produção foi similar nos dois grupos analisados. É interessante notar que além de expressarem menor quantidade, o pico de expressão ocorreu com 3 horas nos indivíduos do grupo controle e com 12 horas nos pacientes com a doença ativa.



**Figura 4.12:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para granulinsina em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos controle (C – n=5) e pacientes com paracoccidioidomicose ativa (PCM – n=7) estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) por diferentes intervalos de tempo. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM da expressão relativa determinado como descrito no item 3.10.4 em material e métodos. Teste estatístico: *t* de student: os valores de *p* estão destacados no gráfico.

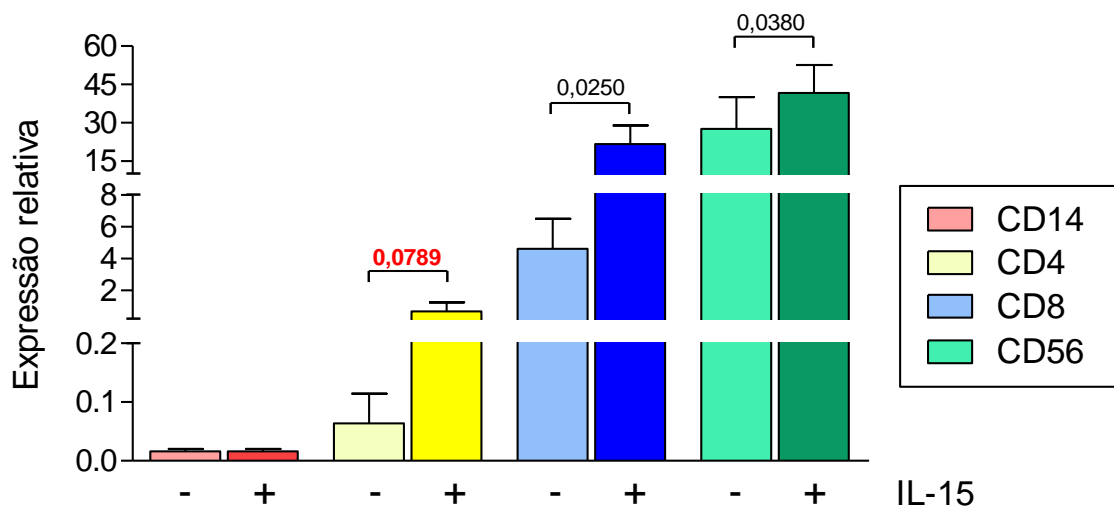
Para verificar se a expressão do RNAm para granulinsina nas CMSP refletem a expressão desse RNAm por células CD56<sup>+</sup>, decidimos então comparar a expressão em diferentes populações celulares. Para isso, analisamos a expressão do RNAm em diversos tipos de preparação de células obtidos por meio

de separação imunomagnética (utilizando anticorpos específicos como descrito em materiais e métodos). Como pode ser observado na figura 4.13 a maior expressão de granulicina foi encontrada nas células CD56<sup>+</sup> (aproximadamente 30 vezes em relação à CMSP) seguida das células CD8<sup>+</sup> (aproximadamente 6 vezes mais em relação às CMSP).



**Figura 4.13:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para granulicina em populações de células separadas por isolamento imunomagnético (células mononucleares do sangue periférico (CMSP – n=3), neutrófilos (n=2) e células CD14<sup>+</sup> (n=4), CD4<sup>+</sup> (n=4), CD8<sup>+</sup> (n=5) e CD56<sup>+</sup> (n=7) de controles normais. Resultados expressos como média ± EPM da expressão relativa determinado como descrito no item 3.10.4 em material e métodos.

Com o intuito de analisar o possível efeito da IL-15 sobre a expressão da granulicina em células CD14<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup>, após o isolamento, os diferentes tipos de células foram estimulados ou não por 24 horas com IL-15 recombinante. A análise dos resultados demonstrou que o estímulo com IL-15 é capaz de aumentar a expressão do RNAm para granulicina de todos os tipos de células analisados, com exceção das células CD14<sup>+</sup> (figura 4.14).



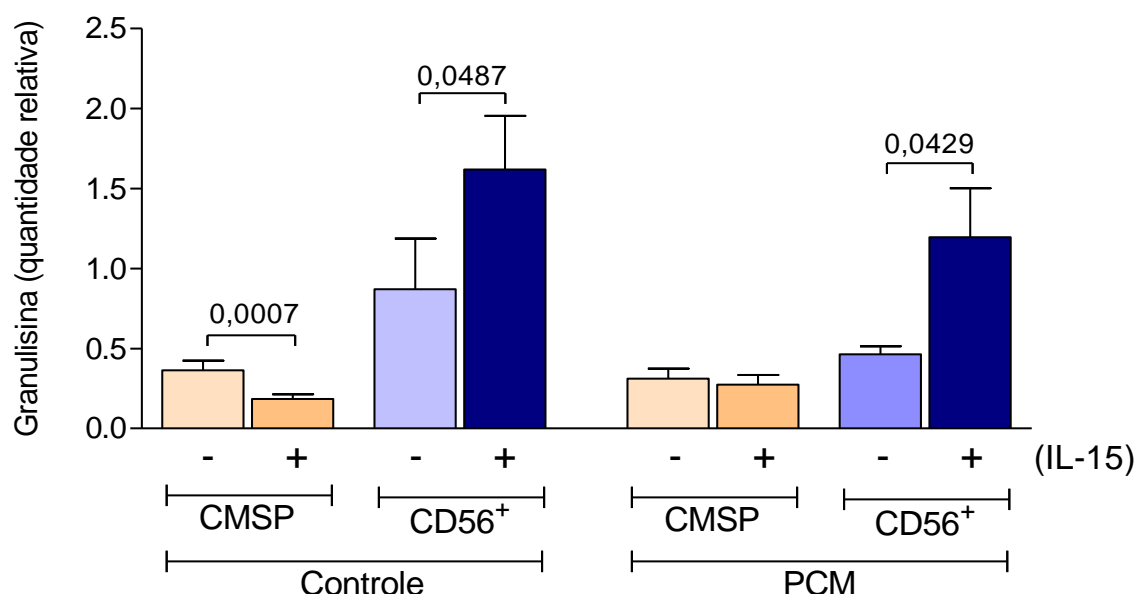
**Figura 4.14:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para granulinsina em populações de células separadas por isolamento imunomagnético: células CD14<sup>+</sup> (n=4), CD4<sup>+</sup> (n=4), CD8<sup>+</sup> (n=5) e CD56<sup>+</sup> (n=7) de controles normais, estimulados (+) ou não (-) com IL-15 recombinante. Resultados expressos como média ± EPM da expressão relativa determinado como descrito no item 3.10.4 em material e métodos. Teste estatístico: teste *t* pareado - os valores de *p* estão destacados no gráfico.

#### 4.11 Granulinsina é liberada por células CD56<sup>+</sup> de indivíduos do grupo controle e pacientes com doença ativa em coculturas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Níveis de granulinsina aumentam com IL15.

Além dos testes descritos acima, decidimos verificar se nas coculturas de células CD56<sup>+</sup> e leveduras de *P. brasiliensis* ocorre a liberação de granulinsina. Propusemos-nos então, a desenvolver um ELISA para a detecção dessa substância no sobrenadante de cultura de células, na presença de células leveduriformes da cepa Pb18 de *P. brasiliensis*, com ou sem estímulo de IL-15 por 48 horas. Como pode ser observado na figura 4.15, detectamos as maiores



quantidades de granulicina no sobrenadante de coculturas de células CD56<sup>+</sup> provenientes tanto de indivíduos controle (C), como pacientes com paracoccidioidomocose ativa (PCM), enquanto que CMSP apresentaram pequena liberação. Ao contrário do demonstrado para a expressão do RNAm, não houve diferenças significativas entre as os dois grupos de indivíduos testados (embora a quantidade de granulicina nas culturas de células provenientes de indivíduos do grupo controle seja superior) (Fig. 4.15).



**Figura 4.15:** Níveis de granulicina detectados no sobrenadante de coculturas de células CD56<sup>+</sup> ou CMSP e células leveduriformes de *P. brasiliensis* da cepa Pb18. As diferentes populações celulares foram estimuladas (+) ou não (-) com IL-15 recombinante (5ng/mL). Coculturas de células provenientes de controles normais (n=6) e de células provenientes de indivíduos com paracoccidioidomocose ativa (PCM – n=6). Os valores são expressos em quantidade relativa, obtida pela divisão das médias de absorbância de cada uma das amostras de sobrenadante (após subtração da absorbância do branco), pela média de absorbância da amostra controle (também subtraída do branco), conforme descrito em materiais e métodos. Valores representam a média ± EPM. Teste estatístico: teste *t* pareado, os valores de *p* estão destacados nos gráficos.

Apesar de não termos sido capazes (por dificuldades técnicas) de avaliar a real participação da granulicina na morte direta das células fúngicas, os experimentos descritos acima, demonstraram que as células CD56<sup>+</sup> expressam

grandes quantidades do RNAm para esse constituinte dos grânulos citotóxicos e são capazes de secretar a proteína em resposta a estimulação com o fungo. Dessa forma podemos supor que a liberação de granulicina no sobrenadante dessas coculturas pode ser responsável, ao menos em parte pela capacidade fungicida demonstrada por essas células e que se mostrou independente da presença de perforina. Adicionalmente, o fato da adição de IL-15 aumentar a quantidade de granulicina no sobrenadante e também a capacidade fungicida das células indica um papel para esta molécula na resposta de defesa contra o fungo.

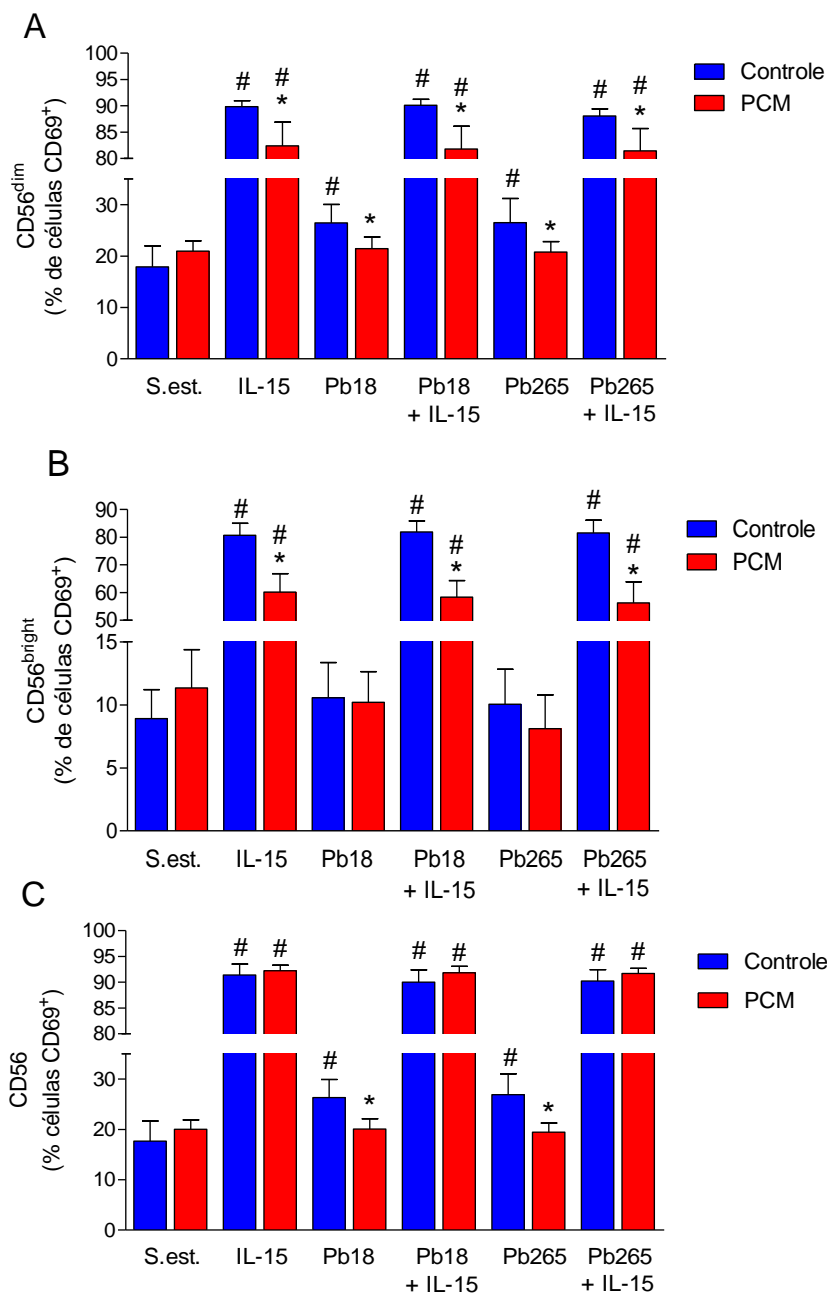
#### **4.12 A exposição de células CD56<sup>+</sup> a leveduras de *P. brasiliensis* leva ao aumento de marcadores de ativação no grupo de indivíduos controle, mas não de pacientes com paracoccidiodomicose. A IL-15 aumenta a expressão nos dois grupos**

Os resultados descritos acima indicam que células CD56<sup>+</sup> provenientes de pacientes com paracoccidiodomicose e indivíduos do grupo controle respondem de maneira diferencial aos estímulos com leveduras de *P. brasiliensis* e com IL-15. Com o intuito de verificar se isso ocorre devido à menor ativação das células, decidimos analisar por citometria de fluxo a expressão de moléculas de superfície usualmente utilizadas para avaliar essa ativação (CD69 e CD25).

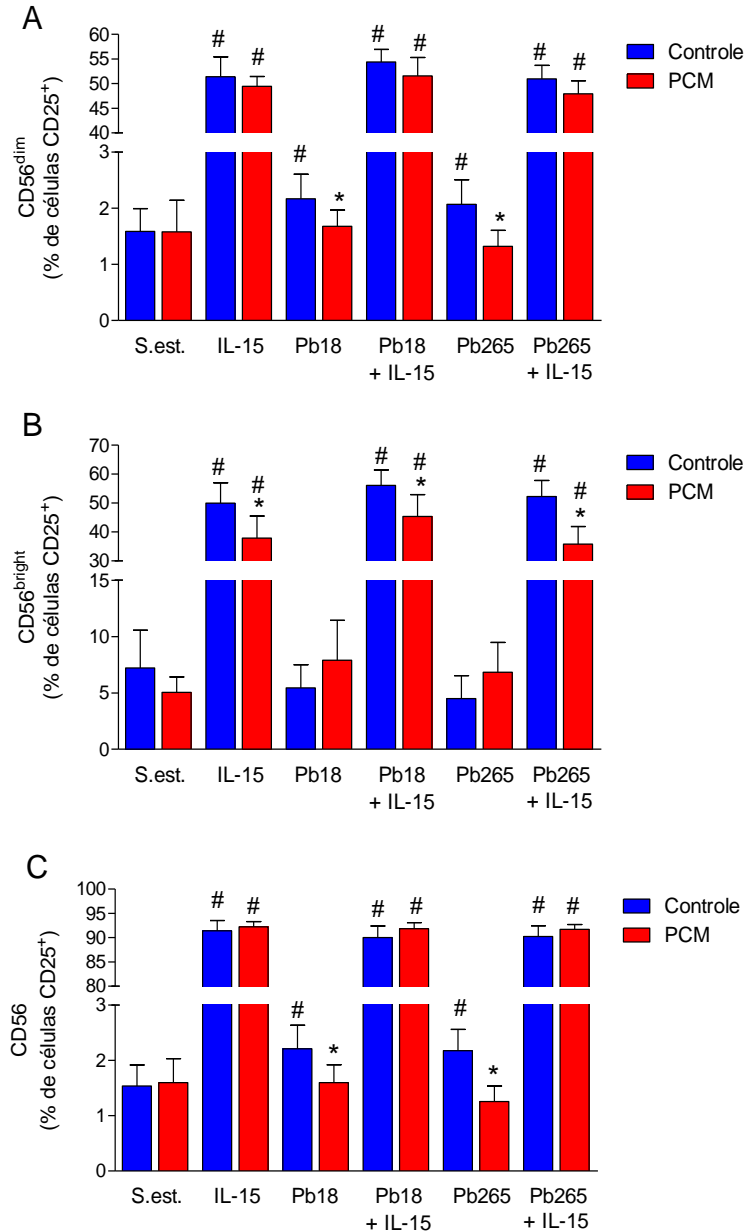
A análise foi realizada tanto na população de células CD56<sup>bright</sup> como na população de células CD56<sup>dim</sup> e observamos que esses marcadores são expressos pelas duas populações (**ver “dot-plots” representativos no item 8.12 – figuras 8.13 e 8.14 do “Apêndice”**), e que os estímulos atuam de maneira

diferente nas mesmas. Dessa forma nos gráficos abaixo estão demonstrados os resultados obtidos na população de células CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup> e CD56 total (CD56<sup>bright</sup> + CD56<sup>dim</sup>).

Os resultados obtidos demonstraram que células de indivíduos do grupo controle passam a expressar maior quantidade de marcadores de ativação (CD69 – figura 4.16 e CD25 – figura 4.17) quando estimulados com leveduras de ambas as cepas de *P. brasiliensis*, o mesmo não ocorrendo com células de pacientes com paracoccidioidomicose (figura 4.16 e figura 4.17). Já o estímulo com IL-15 aumentou consideravelmente os marcadores de ativação tanto nas células de pacientes como nas células provenientes de indivíduos do grupo controle, entretanto esse aumento foi maior no último grupo.



**Figura 4.16:** Análise por citometria de fluxo da expressão de CD69 em células apresentando baixa expressão de CD56 (CD56<sup>dim</sup> - **A**), alta expressão de CD56 (CD56<sup>bright</sup> - **B**), ou na população de CD56<sup>+</sup> total (**C**). As células foram isoladas de indivíduos do grupo controle (n=10) e de pacientes com paracoccidiodomicose (n=8), não estimuladas (S.est.) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Os dados representam a média ± EPM da porcentagem de células positivas para CD69. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos controle submetidos às mesmas condições; #  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).



**Figura 4.17:** Análise por citometria de fluxo da expressão de CD25 em células apresentando baixa expressão de CD56 (CD56<sup>dim</sup> - **A**), alta expressão de CD56 (CD56<sup>bright</sup> - **B**), ou na população de CD56<sup>+</sup> total (**C**). As células foram isoladas de indivíduos do grupo controle (n=10) e de pacientes com paracoccidiodomicose (n=8), não estimuladas (S.est.) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Os dados representam a média ± EPM da porcentagem de células positivas para CD25. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos controle submetidos às mesmas condições; #  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).

Vale a pena ressaltar que a população CD56<sup>bright</sup> foi a que apresentou as maiores diferenças quando comparadas às células de pacientes e controles após o estímulo com IL-15, tanto em relação à expressão de CD69 como quanto à expressão de CD25 (figura 4.16B e figura 4.17B respectivamente).

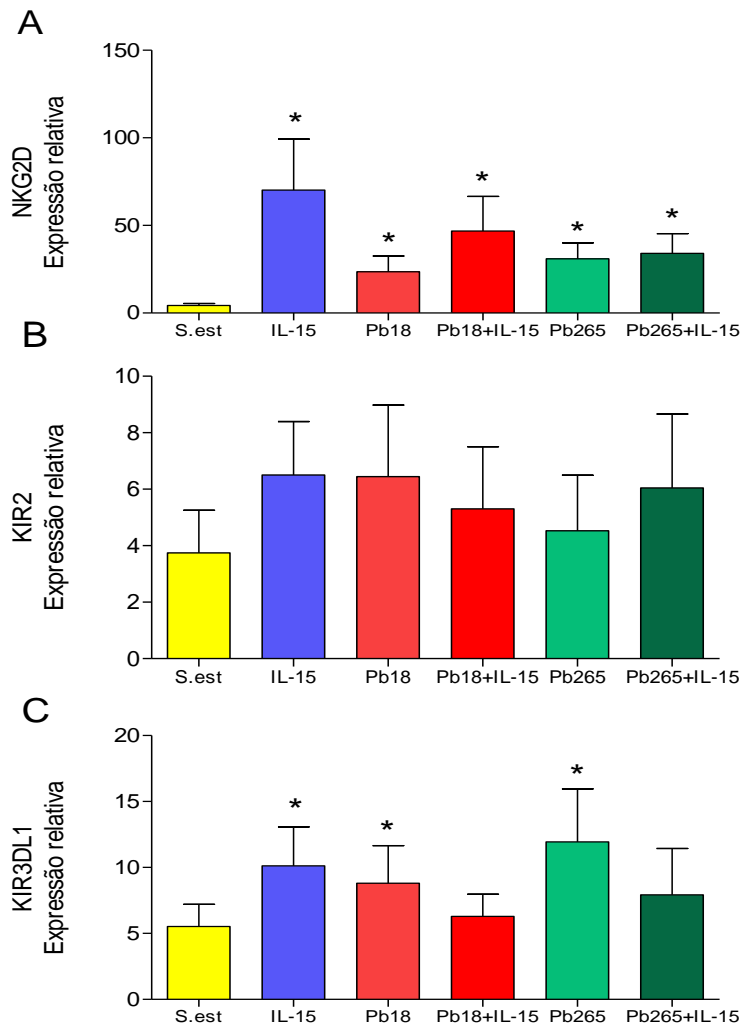
#### **4.13 Avaliação da expressão do receptor de ativação NKG2D e dos receptores de inibição KIR2 e KIR3DL1 em células CD56<sup>+</sup>.**

Os resultados descritos acima demonstram que as células CD56<sup>+</sup> são capazes de reconhecer células leveduriformes de *P. brasiliensis* e de serem ativadas nesse processo de reconhecimento. Para investigar os mecanismos pelos quais as células CD56<sup>+</sup> reconhecem células-alvo infectadas, realizamos uma série de experimentos descritos a seguir.

Como mencionado, o reconhecimento e a ativação de células CD56<sup>+</sup> pelas células-alvo se dá por meio do balanço entre os sinais recebidos por receptores de ativação e receptores inibitórios. Em um primeiro momento decidimos, investigar se a exposição de células CD56<sup>+</sup> a leveduras de *P. brasiliensis* e a IL-15 leva a alteração na expressão do RNAm para o receptor de ativação NKG2D e para os receptores de inibição KIR2 e KIR3DL1, em células CD56<sup>+</sup> isoladas do sangue de indivíduos do grupo controle.

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.18A) a exposição a leveduras de ambas as cepas de *P. brasiliensis* leva a um aumento significativo na expressão do RNAm para NKG2D nas células CD56<sup>+</sup>, o mesmo acontecendo quando as células são estimuladas com IL-15 recombinante. Em relação aos

receptores inibitórios KIR2 e KIR3DL1 observamos uma variação muito grande nos resultados, entretanto o estímulo com IL-15 e com as cepas de *P. brasiliensis* também parecem aumentar a expressão do RNAm para KIR3DL1, não alterando a expressão do KIR2 (figura 4.18C e 4.18B respectivamente).



**Figura 4.18:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para NKGD2 (A), KIR2 (B) e KIR3DL1 (C) em células CD56<sup>+</sup> isoladas do sangue de indivíduos do grupo controle (n=9) estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Resultados expressos como média ± EPM da expressão relativa determinado como descrito no item 3.10.4 em material e métodos. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).

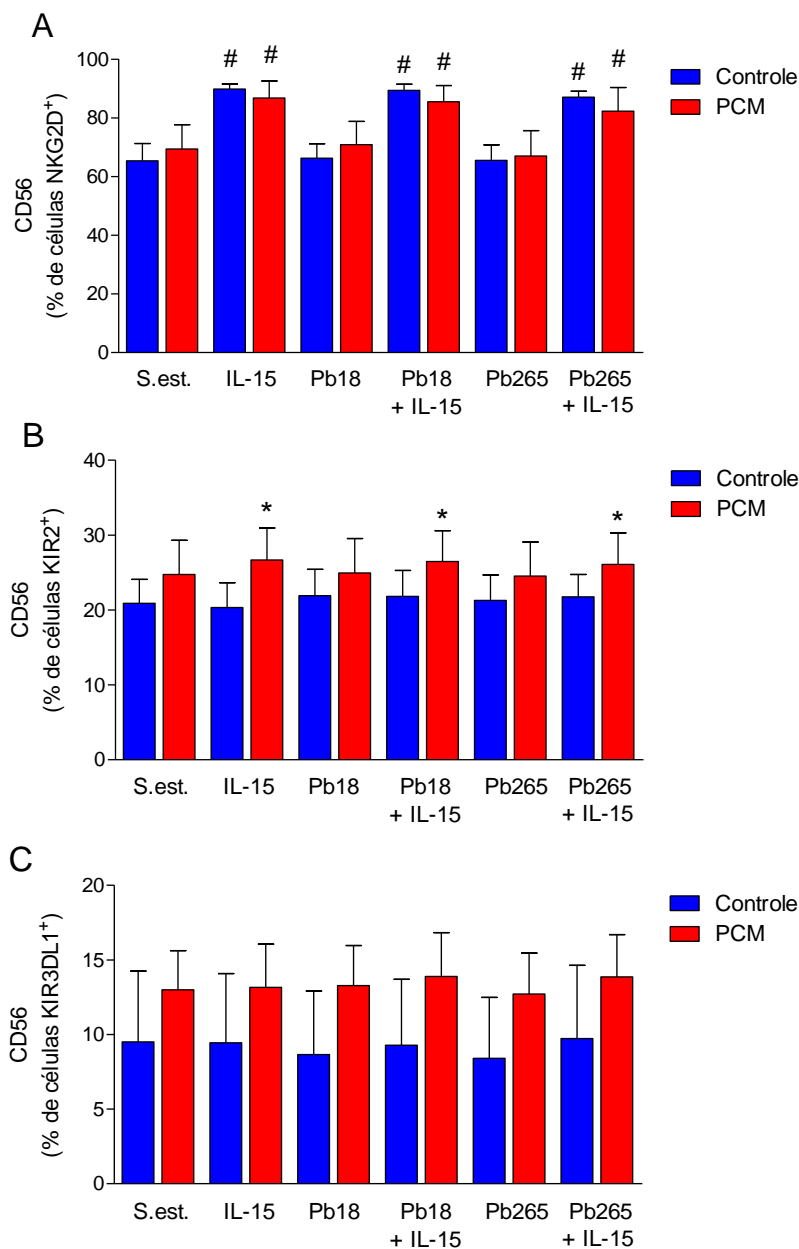
Para confirmar os dados referentes à expressão do RNAm realizamos então experimentos para avaliar os receptores de ativação (NKG2D) e inibitórios (KIR2 e KIR3DL1) na superfície de células CD56<sup>+</sup> provenientes de pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos do grupo controle, por meio da citometria de fluxo.

A análise da expressão de NKG2D mostrou que esse receptor é expresso pela maioria das células CD56<sup>+</sup>, tanto na população CD56<sup>bright</sup> quanto na população de células CD56<sup>dim</sup> (**ver “dot-plots” representativos no item 8.13 – figura 8.15 do “Apêndice”**). Entretanto, de modo diverso dos achados em relação ao RNAm, observamos aumento da expressão desse receptor somente quando as células foram estimuladas com IL-15 recombinante, não havendo alteração significativa com o estímulo com as leveduras de *P. brasiliensis* (figura 4.19A). Também não observamos diferenças entre os grupos analisados.

Em relação à expressão dos receptores inibitórios KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1 observamos que esses receptores são expressos exclusivamente pela população de células CD56<sup>dim</sup> (**ver “dot-plots” representativos no item 8.13 – figuras 8.16 e 8.17 do “Apêndice”**) e que nenhum dos estímulos utilizados alterou a expressão inicial, em nenhum dos grupos analisados (figuras 4.19B e C). Entretanto, quando comparamos as células de pacientes e controles, observamos que células CD56<sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose expressam maior quantidade de KIR2DL2/L3/S2 em sua superfície após o estímulo com IL-15 (figura 4.19B).



Também foi notável que dos 10 indivíduos do grupo controle analisados apenas 4 apresentaram níveis detectáveis de KIR3DL1 na superfície de suas células, enquanto que todos os 8 pacientes analisados apresentaram esse receptor (ver “dot-plots” representativos no item 8.13 – figuras 8.18 e 8.19 do “Apêndice”)

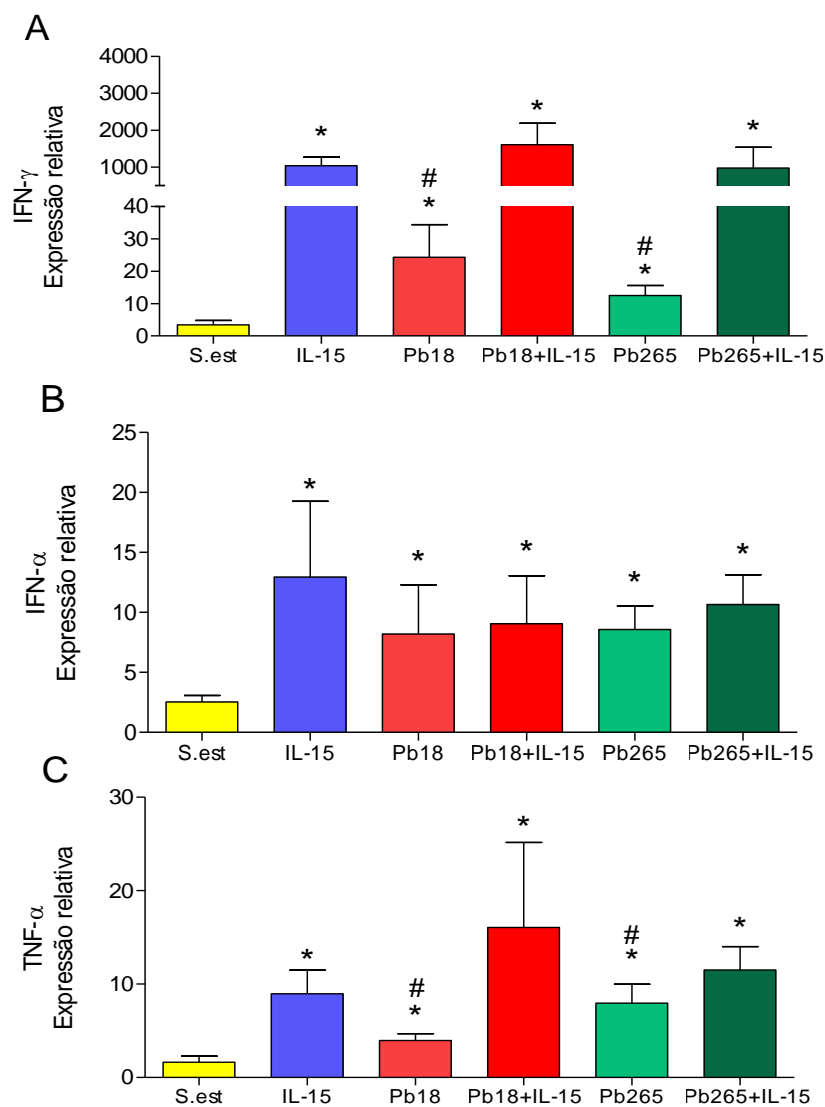


**Figura 4.19 (página anterior):** Análise por citometria de fluxo da expressão de NKG2D (A), KIR2DL2/L3/S2 (B) e KIR3DL1 (C) em células CD56<sup>+</sup> isoladas de indivíduos do grupo controle (n=10) e de pacientes com paracoccidiodomicose (n=8), não estimuladas (S.est.) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Os dados representam a média ± EPM da porcentagem de células positivas para cada parâmetro. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos controle submetidos às mesmas condições; #  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).

#### **4.14 Células CD56<sup>+</sup> estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* produzem IFN- $\gamma$ .**

Além de atuarem como células citotóxicas, as células “Natural Killer” também são importantes como fonte de citocinas, em particular de IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . Essa capacidade pode interferir diretamente com a resposta imunológica subsequente e dessa forma na evolução da infecção. Com o intuito de avaliar se as células CD56<sup>+</sup> expostas a células leveduriformes de *P. brasiliensis* são capazes de produzir citocinas avaliamos em um primeiro momento a expressão do RNAm em células CD56<sup>+</sup> isoladas de indivíduos do grupo controle estimuladas com IL-15 e com as cepas de *P. brasiliensis* na presença ou na ausência de IL-15.

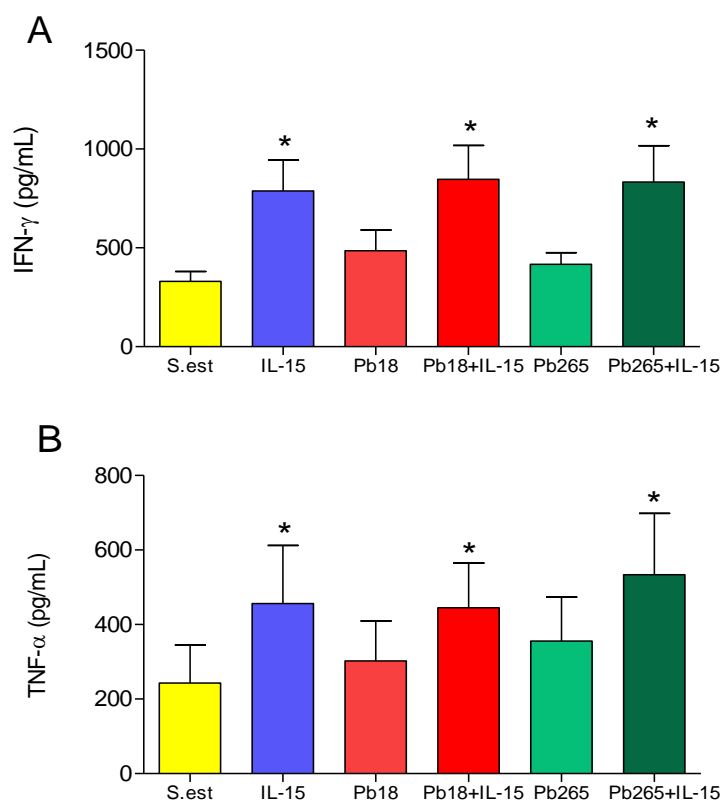
Como pode ser observado na figura abaixo, o estímulo com IL-15 recombinante leva a um aumento na expressão do RNAm de todas as citocinas avaliadas (figura 4.20). É notável, entretanto, o aumento que houve na expressão do RNAm para IFN- $\gamma$  após o estímulo com IL-15 (de até 1000 vezes) em relação às células não estimuladas (figura 4.20A). Também observamos que a exposição às leveduras de *P. brasiliensis* induz um aumento na expressão do RNAm das citocinas analisadas.



**Figura 4.20:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para IFN- $\gamma$  (A), IFN- $\alpha$  (B) e TNF- $\alpha$  (C) em células CD56<sup>+</sup> isoladas do sangue de indivíduos do grupo controle (n=9) estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM da expressão relativa determinado como descrito no item 3.10.4 em material e métodos. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.); #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL-15.

Para confirmar os resultados obtidos com a expressão do RNAm fizemos a dosagem das citocinas nos sobrenadantes das mesmas culturas utilizadas para a

extração do RNA. Conforme pode ser observado na figura abaixo (figura 4.21) o estímulo com IL-15 (sozinha ou juntamente com as células fúngicas) levou a um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  pelas células CD56<sup>+</sup> (figura 4.21A e B respectivamente). O estímulo com as leveduras de *P. brasiliensis* sem a presença de IL-15 também levou a uma produção maior em relação às células não estimuladas (embora não tenha sido estatisticamente significativo).

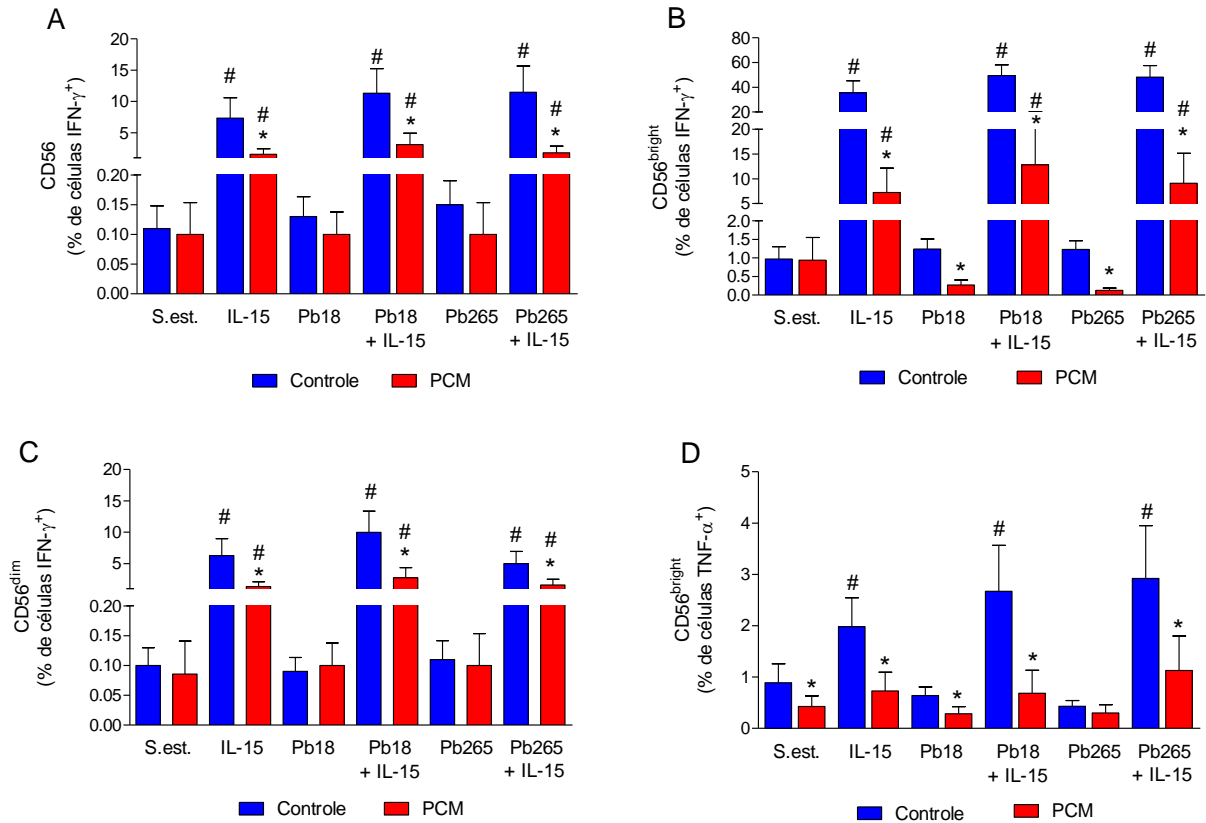


**Figura 4.21:** Análise da produção de IFN- $\gamma$  (**A**) e TNF- $\alpha$  (**B**) no sobrenadante de culturas de células CD56<sup>+</sup> (NK) não estimuladas (S.E.) ou estimuladas com IL-15 (5 ng/mL) e células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265) sozinhas ou em combinação com IL15. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Bonferroni. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas.

Após termos realizados os testes descritos acima, analisamos por citometria de fluxo a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas células CD56<sup>+</sup> de pacientes

com paracoccidiodomicose e indivíduos do grupo controle. Assim como em outros experimentos as células CD56<sup>+</sup> foram separadas em duas populações (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>). Observamos que só houve produção significativa de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas células estimuladas com IL-15 recombinante, não havendo alteração quando as células foram estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis*. É interessante notar que a expressão de TNF- $\alpha$  foi encontrada exclusivamente na população CD56<sup>bright</sup> (figura 4.22D) e o IFN- $\gamma$  embora seja produzido por ambas as populações, a maior expressão também foi encontrada na população de células com alta expressão de CD56 (figura 4.22B) (**ver “dot-plots” representativos no item 8.15 – figura 8.20 do “Apêndice”**).

Quando comparamos os grupos, observamos que as células de pacientes com paracoccidiodomicose apresentam uma menor expressão de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) quando comparadas aos indivíduos do grupo controle.



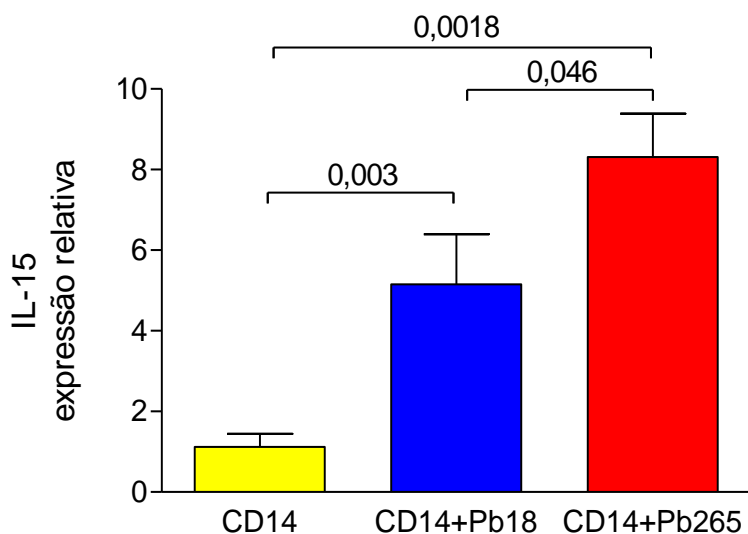
**Figura 4.22:** Análise por citometria de fluxo da expressão de IFN- $\gamma$  (**A a C**) na população de células CD56<sup>+</sup> total (**A**), em células apresentando baixa expressão de CD56 (CD56<sup>dim</sup> - **B**) e alta expressão de CD56 (CD56<sup>bright</sup> - **C**) e de TNF- $\alpha$  em células apresentando alta expressão de CD56 (CD56<sup>bright</sup> - **D**). As células foram isoladas de indivíduos do grupo controle (n=10) e de pacientes com paracoccidiodomicose (n=8), não estimuladas (S.est.) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100) e com IL-15 recombinante (5 ng/mL) por 24 horas. Os dados representam a média  $\pm$  EPM da porcentagem de células positivas para cada citocina. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos controle submetidos nas mesmas condições; #  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).

#### **4.15 Células CD14<sup>+</sup> infectadas com leveduras de *P. brasiliensis* aumentam a expressão do RNAm para IL-15.**

Todos os resultados apresentados anteriormente demonstram que a IL-15 apresenta uma função extremamente importante para as atividades desempenhadas pelas células CD56<sup>+</sup>. A IL-15 é produzida exclusivamente por células de origem mielóide (monócitos, macrófagos e células dendríticas). Com o intuito de verificar se a presença de células leveduriformes de *P. brasiliensis* induz a produção de IL-15 pelas células CD14<sup>+</sup> tentamos em um primeiro momento dosar essa citocina nos sobrenadantes de cultura, mas devido ao pequeno volume de sobrenadante disponível e à relativa baixa sensibilidade do ELISA disponível no laboratório (DuoSet Kit – R&D Systems) que inviabiliza a utilização de amostras diluídas, não conseguimos detectar essa citocina (dados não mostrados). Como alternativa decidimos então determinar a expressão do RNAm para IL-15, por meio da quantificação relativa por qRT-PCR, em culturas de células CD14<sup>+</sup> de indivíduos do grupo controle estimuladas ou não com células leveduriformes da cepa Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis*.

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.23), a presença de células do fungo é capaz de aumentar significativamente a expressão do RNAm para IL-15 em comparação às células CD14<sup>+</sup> cultivadas isoladamente. Também é possível notar que o estímulo com as leveduras da cepa avirulenta Pb265 foi mais efetivo.

Apesar do aumento da expressão do RNAm não necessariamente indicar que há um aumento proporcional na produção dessa citocina, os dados obtidos são indicativos do potencial dessas células para essa produção.



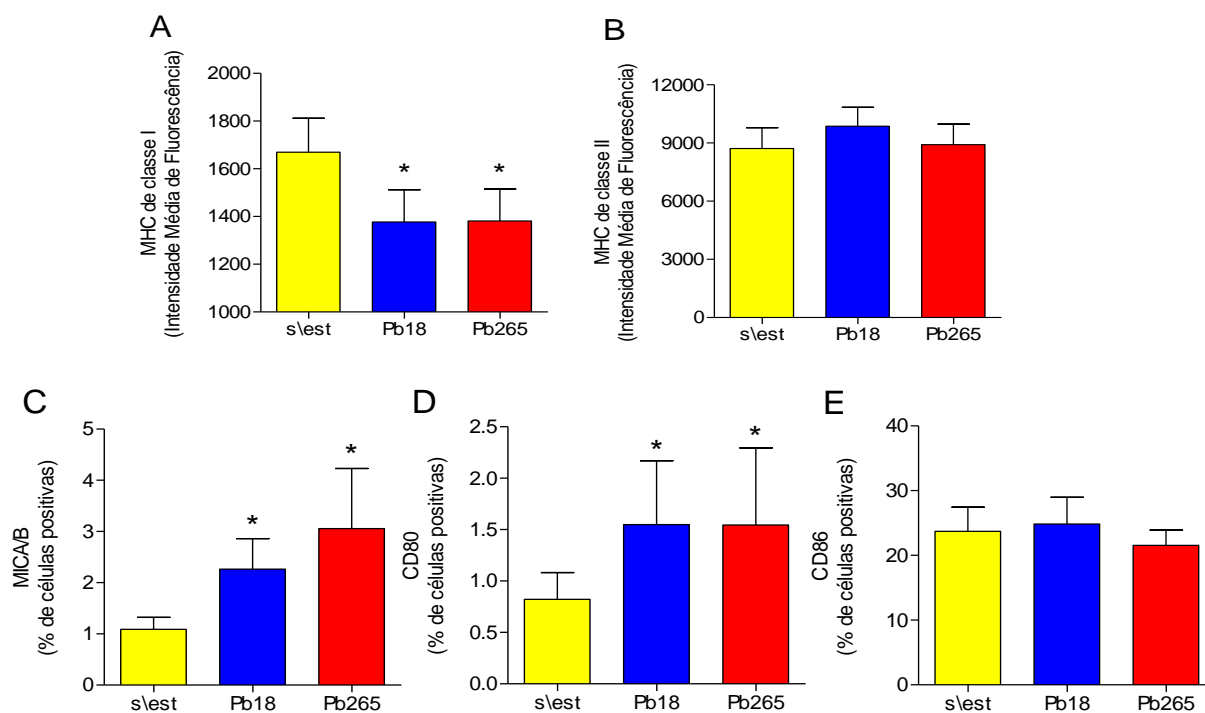
**Figura 4.23:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL-15 em culturas de células CD14<sup>+</sup> de controles normais (n=6) não estimuladas ou estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265). Os valores estão demonstrados como expressão relativa determinada como descrito no item 3.10.4 em materiais e métodos. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni. Os valores de *p* estão destacados no gráfico.

#### 4.16 Células CD14<sup>+</sup> cultivadas na presença de leveduras de *P. brasiliensis* diminuem a expressão de moléculas de MHC de classe I em sua superfície.

Um dos mecanismos utilizados pelas células NK para reconhecer células infectadas é por meio da diminuição de moléculas de MHC de classe I na superfície ou pelo aumento de ligantes para os receptores estimulatórios (NKG2D



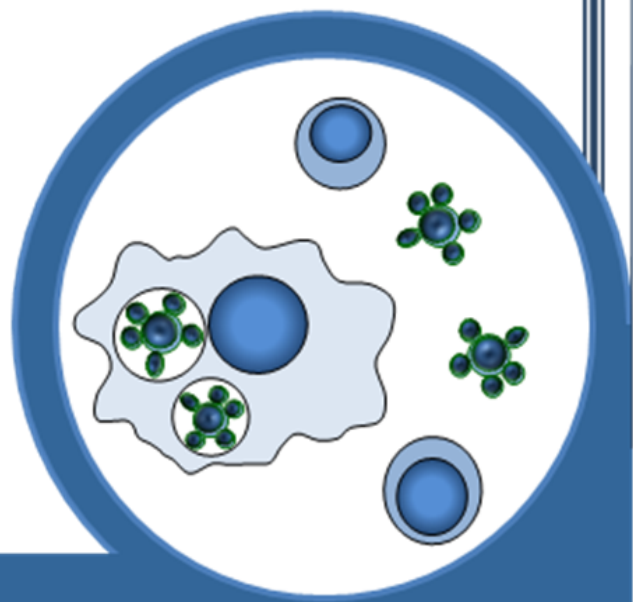
– MICA/B). Com o intuito de verificar se células CD14<sup>+</sup> infectadas com leveduras de *P. brasiliensis* alteram a expressão de moléculas associadas à ativação e/ou inibição de células CD56<sup>+</sup> realizamos experimentos por citometria de fluxo analisando a expressão de MHC de classe I e classe II, das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 e dos receptores de ativação MICA/B. Os resultados demonstraram que após a exposição a leveduras de *P. brasiliensis* (de ambas as cepas) houve diminuição significativa na expressão de moléculas de MHC de classe I na superfície dos monócitos (figura 4.24A – expresso em intensidade média de fluorescência), embora não altere a porcentagem de células positivas para essa molécula. Também notamos que o número de células positivas para MICA/B e CD80 aumentam após a exposição às leveduras de ambas as cepas (figuras 4.24C e D respectivamente). Não observamos alterações na expressão de moléculas de MHC de classe II e da molécula CD86.



**Figura 4.24 (página anterior):** Análise por citometria de fluxo da expressão de MHC de classe I (A), MHC de classe II (B) (expresso como intensidade média de fluorescência) e de MICA/B (C), CD80 (D) e CD86 (E) (expresso em % de células positivas) em monócitos (células CD14<sup>+</sup>) isolados de indivíduos do grupo controle (n=10) não estimulados (S.est.) ou estimulados com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:50) por 24 horas. Os dados representam a média ± EPM. Teste estatístico ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Bonferroni, \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (S.est.).



# *Discussão*





## 5. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a possível participação de células “Natural Killer” na resposta imunológica à infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

As células NK [94], tradicionalmente relacionadas ao controle de infecções virais e de células tumorais, têm sido recentemente associadas à resistência a outros agentes patogênicos como bactérias e fungos intracelulares [24]. Dentre os poucos trabalhos publicados sobre a participação de células NK na paracoccidioidomicose, destaca-se o realizado por Peraçoli *et al* (1991)[80] no qual foi demonstrado um aumento no número de células NK na circulação dos pacientes, com resposta citotóxica diminuída. Nossos resultados permitiram comprovar parcialmente esses resultados, uma vez que observamos uma menor resposta citotóxica de células CD56<sup>+</sup> isoladas de pacientes apresentando a doença ativa. Por outro lado, não encontramos diferenças significativas entre o número de células NK presentes na circulação de pacientes e dos indivíduos do grupo controle. Essa aparente contradição de resultados, talvez possa ser explicada pela metodologia aplicada em cada um dos trabalhos. É interessante notar também, que após o tratamento efetivo as células de pacientes voltaram a apresentar atividade citotóxica comparável àquela observado nos indivíduos do grupo controle. Esses resultados poderiam indicar que durante a doença em atividade, a resposta imunológica adaptativa em curso, estaria de alguma forma inibindo a resposta de células CD56<sup>+</sup>. Como mencionado, pacientes com a doença ativa da forma adulta e juvenil principalmente, apresentam altos níveis de citocinas

supressoras na circulação como IL-10 e TGF- $\beta$  [6, 7, 9, 10, 12]. Essas citocinas além de inibirem a resposta adaptativa efetiva contra o fungo, também interferem com a atividade das células NK [95-98].

Nossos dados são os primeiros a demonstrar atividade fungicida direta (*in vitro*) de células CD56<sup>+</sup> sobre células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Essa atividade já foi descrita para outros patógenos como o *Cryptococcus neoformans*, o *Toxoplasma gondii* e a *Candida albicans* [87-89]. Também observamos que células CD56<sup>+</sup> apresentam atividade citotóxica contra células-alvo (monócitos) infectadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Em ambos os casos as células provenientes de pacientes apresentaram resposta citotóxica inferior àquela observada com as células de indivíduos do grupo controle.

Nossos resultados relacionados à função dos grânulos citotóxicos na atividade citotóxica direta e contra células-alvo demonstraram que para ambas é necessária a presença dos grânulos, uma vez que a adição de SrCl levou a completa inibição dessa atividade. Embora ambas as funções sejam dependentes de grânulos, a atividade citotóxica direta demonstrou ser independente de perforina, enquanto que a atividade contra células-alvo foi ao menos parcialmente dependente deste constituinte. A importância da perforina em infecções fúngicas já foi demonstrada na infecção causada pelo *Histoplasma capsulatum*, sendo que camundongos “knockout” para perforina infectados com esse fungo apresentam elevada mortalidade, associado ao aumento da carga fúngica [57].

A perforina atua formando poros na membrana celular, com isso desestabilizando a membrana plasmática levando à lise osmótica da célula-alvo,

assim como permitindo a entrada de outros constituintes dos grânulos (granzimas e granulicina) na célula [46-48].

Observamos que para exercer a citotoxicidade direta não foi necessária a presença de perforina, mas sim de outra substância presente nos grânulos, dessa forma, temos por hipótese que essa atividade possa ser dependente, ao menos em parte da granulicina. A granulicina atua diretamente sobre as células, atuando sobre lipídeos presentes na membrana de diversos patógenos, causando sua morte [53, 99, 100]. Sua participação tem sido apontada como fundamental no controle das infecções causadas por micobactérias, tanto na tuberculose como na hanseníase [93, 101]. Além de sua ação citotóxica a granulicina também apresenta função pró-inflamatória e quimiotática [50].

Por meio da análise da expressão gênica pudemos observar que a expressão do RNAm para a granulicina é maior nas células CD8<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup>. Além disso, por meio da análise por citometria de fluxo pudemos observar que células CD56<sup>+</sup> de indivíduos do grupo controle expressam quantidades maiores dessa molécula quando comparadas a células de pacientes com paracoccidiodomicose. Esse fato poderia estar relacionado à menor resposta citotóxica direta observada no grupo de pacientes. Também pudemos observar que nos sobrenadantes de coculturas de células CD56<sup>+</sup> e células leveduriformes de *P. brasiliensis* existe a presença dessa proteína, cuja quantidade aumenta na presença de IL-15. Além disso, em um trabalho recente nosso grupo demonstrou que os níveis séricos de granulicina são maiores em indivíduos saudáveis do que no soro de pacientes com paracoccidiodomicose [102]. Esses fatores nos fazem supor que o contato das células NK com as leveduras leva a liberação dos grânulos citotóxicos



(incluindo a granulísina) e esta possa exercer a sua função fungicida. Apesar de não termos comprovação direta da participação da granulísina na atividade citotóxica contra células-alvo, podemos supor que essa proteína também participe desse processo, que nossos dados demonstraram ser dependentes de perforina. Zhou e col. (2001) [57] demonstraram que a granulísina, apesar de apresentar uma potente ação sobre os patógenos, depende da presença de perforina para atuar no interior das células infectadas.

A relação entre a produção de granulísina e a resposta de defesa contra microrganismos intracelulares é evidenciada na hanseníase, na qual é detectada em uma frequência pelo menos 6 vezes mais elevada em células infiltrantes em lesões localizadas de pacientes com a forma benigna (tuberculóide) em contraste com as lesões que caracterizam a forma disseminada da doença (lepromatosa) [101]. Na tuberculose a expressão coordenada da quimiocina CCL5, perforina e granulísina por macrófagos de indivíduos previamente sensibilizados garante o seu potencial em atrair células infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* e lisá-las [93]. Quando as células T e células NK matam as células alvo *in vitro* ocorre um aumento da concentração de granulísina no sobrenadante de culturas, devido à exocitose dos grânulos.

Nossos dados demonstraram que as células CD56<sup>+</sup> apresentam a capacidade de reconhecer leveduras de *P. brasiliensis* (de maneira independente da presença de outras células), e de serem ativadas por esse patógeno. É interessante notar que essa ativação ocorre de maneira diferenciada contra duas cepas de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 – virulenta e cepa Pb265 – avirulenta), sendo maior contra a cepa avirulenta. A principal diferença entre as duas cepas

analisadas é a constituição de sua parede celular. Como mencionado, o *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, e a mudança da forma miceliana para a forma de leveduras é essencial para que a infecção seja bem sucedida [103]. San-Blas (1993) [104] realizou estudo no qual foi determinado que o dimorfismo do *P. brasiliensis* pode ser controlado pela síntese dos polissacarídeos que compõem a parede celular, como os glucanos. O  $\alpha$ -glucano é o principal polissacarídeo presente nas paredes celulares de leveduras, enquanto que na forma miceliana o  $\beta$ -glucano é o único polissacarídeo presente [104]. Além disso, demonstrou-se que as cepas mais virulentas do *P. brasiliensis* apresentam menor quantidade de  $\beta$ -glucano na composição de suas paredes, ao contrário das cepas avirulentas que apresentam grande quantidade desse carboidrato e induzem a uma resposta inflamatória bastante exacerbada [105].

Diferentes receptores expressos na superfície das células do sistema imunológico inato são capazes de reconhecer e serem ativados pelo  $\beta$ -glucano. Dentre esses receptores se destacam o receptor do tipo toll-2 (TLR2), a dectina-1 e o receptor de complemento 3 (CR3) [106].

Apesar de estudos iniciais não detectarem a expressão de TLRs em células NK, estudo recentes demonstram que essas células expressam esses receptores e são ativadas de maneira específica por seus ligantes [107-114]. Também foi demonstrado que células NK são capazes de reconhecer micobactérias por meio do TLR2, e que esse reconhecimento leva a um aumento da capacidade citotóxica contra células-alvo infectadas, assim como ao aumento da capacidade de produção de IFN- $\gamma$  [109]. Aparentemente as células NK não

expressam dectina-1, sendo esse receptor específico de células de origem mielóide [115].

Além dos receptores do tipo toll (especialmente o TLR2) e da dectina-1, o  $\beta$ -glucano também pode ser reconhecido por outros receptores expressos na superfície das células do sistema imunológico, como por exemplo, o receptor de complemento 3 (CR3) [106]. O CR3 é uma glicoproteína de membrana heterodimérica da família das  $\beta$ 2-integrinas, composta pela molécula de CD11b associada com a molécula de CD18. O CR3 é expresso em grandes quantidades por alguns tipos celulares, como neutrófilos, monócitos e células NK [116]. Alguns estudos demonstraram que a ativação de células NK via CR3 leva a um aumento da capacidade citotóxica dessas células, tanto contra células infectadas por patógenos como contra células tumorais [117, 118].

Os dados referentes à expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos (perforina, granzima A e granzima B) demonstraram que células CD56<sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose expressam uma maior quantidade dessas moléculas quando comparadas com células provenientes de indivíduos do grupo controle. Esses resultados, associados à resposta citotóxica diminuída, podem indicar que a ativação das células de pacientes para a liberação de grânulos de alguma forma está sendo prejudicada. Conforme pudemos observar, a expressão dos marcadores de ativação CD69 e CD25 foi maior nas células provenientes de indivíduos do grupo controle em comparação às células do grupo de pacientes, após a exposição às leveduras de *P. brasiliensis*. Pudemos também observar que a expressão dessas moléculas, em especial a granzima B e a perforina, é

predominante na população de células CD56<sup>dim</sup>, confirmando dados publicados em outros estudos [28].

Embora as células dos dois grupos aumentem a expressão dos marcadores de ativação (CD69 e CD25) após o estímulo com IL-15, o aumento foi maior nas células do grupo controle. A IL-15 é uma citocina produzida principalmente por monócitos e células dendríticas, com estrutura homóloga a da IL-2. Como mencionado, a IL-15 parece ser essencial para a ativação e manutenção das células citotóxicas, tanto dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, como das células NK [61]. Em nosso estudo confirmamos o importante papel da IL-15 na ativação das células NK (CD56<sup>+</sup>), uma vez que nos diversos experimentos realizados a adição de IL-15 nas coculturas promoveu o aumento da citotoxicidade direta e contra células-alvo. Na infecção por *C. albicans* a IL-15 também atua como um potente estimulador da atividade próinflamatória e antifúngica de polimorfonucleares e monócitos humanos [119]. Neutrófilos de indivíduos normais saudáveis pré-tratados com IL-15 apresentam atividade fungicida aumentada contra *P. brasiliensis*, com elevada produção de ânion superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [120].

Em nosso estudo, as células “natural killer” (CD56<sup>+</sup>) não apresentaram um desempenho tão evidente na eliminação de células-alvo infectadas com a cepa Pb18 quando comparadas às células infectadas pela cepa avirulenta.

Como mencionado, a ativação de células NK contra células-alvo é feita por meio de um balanço entre os estímulos recebidos por receptores inibitórios e estimulatórios [121]. Os dados encontrados demonstraram que a exposição a leveduras de *P. brasiliensis* e a IL-15 leva a um aumento da expressão do receptor estimulatório NKG2D nas células CD56<sup>+</sup> (RNAm e proteína). A indução do

aumento da expressão do NKG2D pela IL-15 já foi demonstrada em estudos publicados anteriormente [42, 43].

Apesar de não termos observado alteração na expressão dos receptores inibitórios (KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1) em células estimuladas com IL-15 ou com o fungo, pudemos observar que células de pacientes apresentam expressão aumentada desses receptores em comparação às células dos indivíduos do grupo controle. Também confirmamos dados publicados anteriormente no que diz respeito a expressão desses receptores de forma exclusiva por células CD56<sup>dim</sup> [28]. Foi notável também que apenas uma parte dos indivíduos do grupo controle apresentou expressão de KIR3DL1, enquanto que todos os pacientes o expressaram. O KIR3DL1 apresenta um grande grau de polimorfismo [41] e alguns trabalhos têm demonstrado que a detecção dessa molécula por citometria de fluxo reflete esse polimorfismo, uma vez que o anticorpo monoclonal utilizado (clone DX9) não é capaz de reconhecer todas as formas de proteína codificadas pelo gene [122, 123]. De fato, a análise por PCR em tempo real demonstrou que todos os indivíduos controle analisados expressam o RNAm para essa proteína, apesar de não termos conseguido demonstrá-la na superfície das células.

Além disso, nossos resultados demonstraram que monócitos expostos a leveduras de *P. brasiliensis* apresentaram uma diminuição na expressão de moléculas de MHC de classe I, bem como um aumento da expressão das moléculas de MICA/B em sua superfície. Dessa forma o aumento da expressão dos receptores estimulatórios (NKG2D) na superfície das células CD56<sup>+</sup> e de seus ligantes (MICA/B) na superfície de monócitos, associado à diminuição dos ligantes dos receptores de inibição (moléculas de MHC de classe I) após os monócitos

serem expostos a leveduras de *P. brasiliensis* poderiam ser associados à resposta citotóxica observada contra células-alvo.

Também observamos que células NK (CD56<sup>+</sup>) expostas a células de *P. brasiliensis*, aumentam a expressão do RNAm para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , assim como são capazes de produzir e secretar essas citocinas. A produção de IFN- $\gamma$  por células NK é induzida por meio da estimulação direta de seus receptores ou de maneira indireta em resposta à presença de citocinas inflamatórias como IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\alpha/\beta$  ou TNF- $\alpha$  produzidas por outras células [26, 124]. Observamos que a exposição de monócitos à leveduras de *P. brasiliensis* leva a um aumento da expressão do RNAm para IL-15 por essas células. Dessa forma, a produção de IL-15, assim como o aumento da expressão dos ligantes para NKG2D (MICA/B) e diminuição dos ligantes para os receptores de inibição (MHC de classe I) por monócitos infectados, poderia ativar as células CD56<sup>+</sup> tanto para o aumento da atividade citotóxica, como para a produção de citocinas como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ . Por sua vez, essa produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células NK, em um mecanismo de retro-alimentação positiva, irá proporcionar as condições ideais de ativação de macrófagos contra patógenos intracelulares [125], incluindo o *P. brasiliensis* [6, 9, 10, 12, 17].

Esse mecanismo de retro-alimentação positiva, na interação de células NK e outras células parece ser importante nos estágios iniciais de diversas infecções. Diversos estudos demonstram a comunicação cruzada entre células NK e células dendríticas derivadas de monócitos (DCs) ou macrófagos após seu recrutamento para os tecidos infectados [71, 126, 127]. As células dendríticas (DCs) são as

principais células apresentadoras de antígenos (APCs), e estão envolvidas na indução da resposta imunológica adaptativa celular contra patógenos intracelulares. Essas células desempenham um papel central na modulação da resposta adaptativa [128, 129]. A interação de DCs com antígenos microbianos representam uma das principais etapas na modulação dessa resposta. Na paracoccidiodomicose, alguns estudos apontam a importância do reconhecimento do fungo pelas células dendríticas para o desenvolvimento de uma resposta imunológica adaptativa adequada [130-132]. Dessa forma, a produção de citocinas pelas células NK, além de influenciarem a resposta de células dendríticas, pode afetar diretamente as células T que se encontram no ambiente de interação, levando à polarização da resposta celular, bem como a uma melhor resposta adaptativa [133].

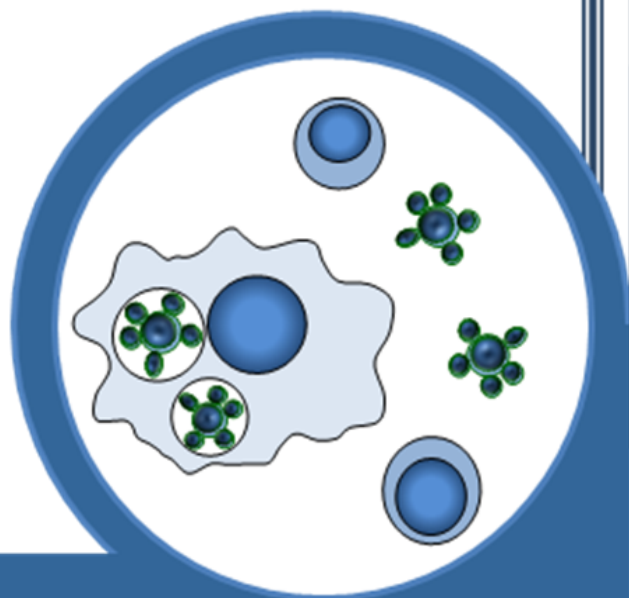
Em resumo, os dados obtidos permitiram demonstrar que as células CD56<sup>+</sup>, apresentam atividade citotóxica direta e contra células-alvo infectadas com células fúngicas de *P. brasiliensis*. Apesar de ainda não ter sido possível determinar a importância da citotoxicidade direta *in vivo*, esse mecanismo poderia ser importante após a destruição da célula alvo e liberação do patógeno no meio extracelular. Assim como em outras doenças causadas por microorganismos intracelulares como a tuberculose e a criptococose, esses resultados podem confirmar que as células CD56<sup>+</sup> contribuem de forma relevante para o controle da infecção causada pelo *P. brasiliensis*. Nossos resultados também demonstraram que a resposta de células CD56<sup>+</sup> é dependente de grânulos, e que a granulicina pode desempenhar um papel preponderante no controle da infecção pelo *P. brasiliensis*. Outro fato importante foi o de termos observado que as células CD56<sup>+</sup>

quando estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* produzem e secretam IFN- $\gamma$ , uma citocina com atuação importante na ativação de outras células do sistema imunológico como macrófagos e linfócitos, e dessa forma pode contribuir para o desenvolvimento da resposta imunológica adquirida subsequente à infecção.





# *Conclusão*





## 6. CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do presente trabalho observamos que:

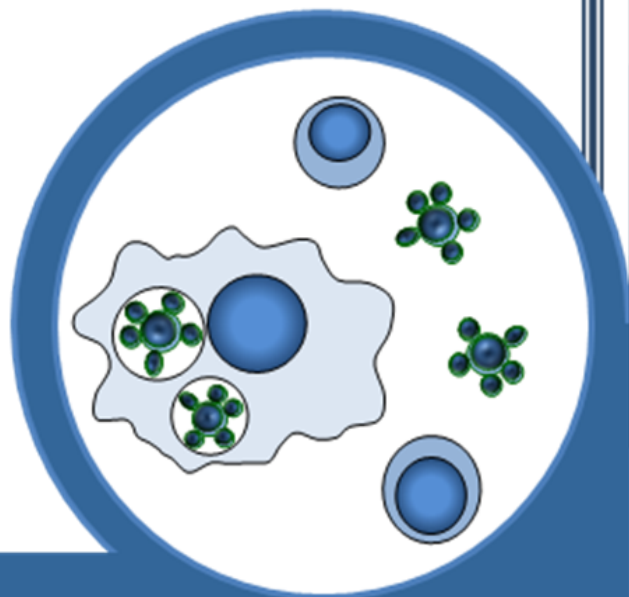
- Não há diferença no número de células CD56<sup>+</sup> (NK - CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> ou NKT – CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose ativa e indivíduos do grupo controle.
- Células CD56<sup>+</sup> de pacientes com doença ativa apresentam resposta citotóxica contra células-alvo inferior àquela observada em indivíduos do grupo controle. Após o tratamento antifúngico efetivo, essa capacidade retorna a níveis normais.
- Células CD56<sup>+</sup> são capazes de reconhecer e de matar diretamente leveduras de *P. brasiliensis*, assim como células-alvo (monócitos) infectadas com o fungo, sendo a atividade superior quando se utilizou leveduras da cepa avirulenta (Pb265).
- A capacidade citotóxica direta contra leveduras e contra células-alvo foi maior nos indivíduos do grupo controle, sendo ambas dependentes de grânulos e aumentadas em resposta ao estímulo com IL-15. Também observamos que a citotoxicidade direta foi independente de perforina, enquanto que a citotoxicidade contra células-alvo foi dependente da presença dessa molécula.
- Células CD56<sup>+</sup>, provenientes de pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos do grupo controle, diferem quanto à expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos (perforina, granzima B e granulicina). Há maior expressão de granzima B e perforina nas células de pacientes, enquanto que a expressão

- de granulicina foi maior nas células de indivíduos do grupo controle. O estímulo com IL-15 também resultou em aumento de expressão desses constituintes.
- A exposição de células CD56<sup>+</sup> a leveduras de *P. brasiliensis* leva à produção e liberação de granulicina nas coculturas.
  - Houve expressão diferencial dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1 em células de pacientes e de indivíduos do grupo controle, sendo que foram mais expressos por células CD56<sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose. Também observamos que o estímulo com IL-15 aumenta a expressão de NKG2D na superfície das células dos dois grupos analisados.
  - A exposição de células CD56<sup>+</sup> a leveduras de *P. brasiliensis* leva a ativação dessas células, principalmente do grupo controle, com aumento da expressão dos marcadores CD69 e CD25. O estímulo com IL-15 aumenta essa expressão nas células dos dois grupos analisados.
  - Células CD56<sup>+</sup> estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* ou com IL-15 passam a expressar e secretar citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Células de indivíduos do grupo controle apresentam maior produção dessas citocinas.
  - A infecção de monócitos com leveduras de *P. brasiliensis* leva a um aumento na expressão do RNAm para IL-15 (notadamente com a levedura avirulenta – Pb265), e induz a diminuição de moléculas de MHC de classe I (ligante de KIRs) e aumento das moléculas de MICA/B (ligantes de NKG2D) na superfície dessas células.

Em conjunto, os dados obtidos nos permitem concluir que as células CD56<sup>+</sup> podem participar ativamente na resposta imunológica inicial contra o *P. brasiliensis*, tanto por meio de reconhecimento e destruição direta das leveduras, quanto por meio da destruição de células infectadas. A citotoxicidade direta mostrou-se dependente de grânulos, mas independente da presença de perforina, sendo que a granulicina é o possível mediador dessa resposta. A resposta citotóxica das células CD56<sup>+</sup> contra células-alvo também foi dependente dos grânulos, mas nesse caso a perforina desempenha um papel preponderante. Ainda em relação ao reconhecimento das células-alvo, nossos resultados demonstraram que essa resposta provavelmente está relacionada à diminuição da expressão de MHC de classe I na superfície de monócitos, associada ao aumento da expressão de NKG2D na superfície das células CD56<sup>+</sup> após a exposição às leveduras do fungo. Além disso, as células CD56<sup>+</sup> poderiam ser fonte importante de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que contribuiriam para o desenvolvimento de uma resposta imunológica adaptativa mais eficiente contra o *P. brasiliensis*. Também concluímos que a IL-15 apresenta papel importante na modulação das respostas efetoras das células CD56<sup>+</sup>, a produção dessa citocina seria feita por monócitos/macrófagos infectados por leveduras de *P. brasiliensis*.



# ***Referências Bibliográficas***







## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Montenegro, M.R., [*Clinical forms of paracoccidioidomycosis*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1986. 28(3): p. 203-4.
2. Franco, M., M.R. Montenegro, R.P. Mendes, S.A. Marques, N.L. Dillon, and N.G. Mota, *Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms*. Rev Soc Bras Med Trop, 1987. 20(2): p. 129-32.
3. Blotta, M.H., R.L. Mamoni, S.J. Oliveira, S.A. Nouer, P.M. Papaiordanou, A. Goveia, and Z.P. Camargo, *Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region*. Am J Trop Med Hyg, 1999. 61(3): p. 390-4.
4. Bethlem, E.P., D. Capone, B. Maranhao, C.R. Carvalho, and B. Wanke, *Paracoccidioidomycosis*. Curr Opin Pulm Med, 1999. 5(5): p. 319-25.
5. Coimbra Junior, C.E., B. Wanke, R.V. Santos, A.C. do Valle, R.L. Costa, and R.M. Zancope-Oliveira, *Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupi-Monde Amerindian populations from Brazilian Amazonia*. Ann Trop Med Parasitol, 1994. 88(2): p. 197-207.
6. Oliveira, S.J., R.L. Mamoni, C.C. Musatti, P.M. Papaiordanou, and M.H. Blotta, *Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls*. Microbes Infect, 2002. 4(2): p. 139-44.

7. Benard, G., C.C. Romano, C.R. Cacere, M. Juvenale, M.J. Mendes-Giannini, and A.J. Duarte, *Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis*. Cytokine, 2001. 13(4): p. 248-52.
8. Benard, G., M.J. Mendes-Giannini, M. Juvenale, E.T. Miranda, and A.J. Duarte, *Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response*. J Infect Dis, 1997. 175(5): p. 1263-7.
9. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis*. Cytokine, 2006. 35(3-4): p. 207-16.
10. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes Paracoccidioides brasiliensis infection from disease*. Cytokine, 2005. 32(1): p. 20-9.
11. Mamoni, R.L., C.L. Rossi, Z.P. Camargo, and M.H. Blotta, *Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis*. Am J Trop Med Hyg, 2001. 65(3): p. 237-41.
12. Mamoni, R.L., S.A. Nouer, S.J. Oliveira, C.C. Musatti, C.L. Rossi, Z.P. Camargo, and M.H. Blotta, *Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis*. Med Mycol, 2002. 40(2): p. 153-9.

13. Cano, L.E., L.M. Singer-Vermes, C.A. Vaz, M. Russo, and V.L. Calich, *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): p. 1777-83.
14. Juvenale, M., G.M. Del Negro, A.J. Duarte, and G. Benard, *Antibody isotypes to a Paracoccidioides brasiliensis somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis*. J Med Microbiol, 2001. 50(2): p. 127-34.
15. Baida, H., P.J. Biselli, M. Juvenale, G.M. Del Negro, M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte, and G. Benard, *Differential antibody isotype expression to the major Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis*. Microbes Infect, 1999. 1(4): p. 273-8.
16. Calich, V.L. and S.S. Kashino, *Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of Paracoccidioides brasiliensis infection*. Braz J Med Biol Res, 1998. 31(5): p. 615-23.
17. Calich, V.L., C.A. Vaz, and E. Burger, *Immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection*. Res Immunol, 1998. 149(4-5): p. 407-17; discussion 499-500.
18. Vaz, C.A., L.M. Singer-Vermes, and V.L. Calich, *Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent Paracoccidioides brasiliensis isolates*. Am J Trop Med Hyg, 1998. 59(6): p. 971-7.

19. Kashino, S.S., R.A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L.H. Meloni-Bruneri, C.A. Vaz, E. Burger, L.M. Singer, and V.L. Calich, *Resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production*. J Interferon Cytokine Res, 2000. 20(1): p. 89-97.
20. Calich, V.L., T.A. da Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F.V. Loures, L.R. Ribeiro, R. de Cassia Valente-Ferreira, and A. Pina, *Innate immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection*. Mycopathologia, 2008. 165(4-5): p. 223-36.
21. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. 9(1): p. 4-9.
22. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. 343(5): p. 338-44.
23. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini, *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. 9(5): p. 503-10.
24. Kirwan, S.E. and D.N. Burshtyn, *Regulation of natural killer cell activity*. Curr Opin Immunol, 2007. 19(1): p. 46-54.
25. Lieberman, N. and O. Mandelboim, *The role of NK cells in innate immunity*. Adv Exp Med Biol, 2000. 479: p. 137-45.
26. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006. 20(3): p. 123-37.
27. Batoni, G., S. Esin, F. Favilli, M. Pardini, D. Bottai, G. Maisetta, W. Florio, and M. Campa, *Human CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with Mycobacterium*

- bovis bacillus Calmette-Guerin*. Scand J Immunol, 2005. 62(6): p. 498-506.
28. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. 22(11): p. 633-40.
29. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. 97(10): p. 3146-51.
30. Gonzalez, S., A. Lopez-Soto, B. Suarez-Alvarez, A. Lopez-Vazquez, and C. Lopez-Larrea, *NKG2D ligands: key targets of the immune response*. Trends Immunol, 2008. 29(8): p. 397-403.
31. Biassoni, R., *Natural killer cell receptors*. Adv Exp Med Biol, 2008. 640: p. 35-52.
32. Uhrberg, M., *The KIR gene family: life in the fast lane of evolution*. Eur J Immunol, 2005. 35(1): p. 10-5.
33. Lanier, L.L., *NKG2D in innate and adaptive immunity*. Adv Exp Med Biol, 2005. 560: p. 51-6.
34. Hamerman, J.A., K. Ogasawara, and L.L. Lanier, *NK cells in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2005. 17(1): p. 29-35.
35. Lodoen, M.B. and L.L. Lanier, *Natural killer cells as an initial defense against pathogens*. Curr Opin Immunol, 2006. 18(4): p. 391-8.
36. Jamieson, A.M., A. Diefenbach, C.W. McMahon, N. Xiong, J.R. Carlyle, and D.H. Raulet, *The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing*. Immunity, 2002. 17(1): p. 19-29.

37. Raulet, D.H., R.E. Vance, and C.W. McMahon, *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire*. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 291-330.
38. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, F. Partheniou, A.M. Little, and P. Parham, *MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response*. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2369-80.
39. Parham, P., *The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity*. *Semin Immunol*, 2008. 20(6): p. 311-6.
40. Parham, P., *Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors*. *Mol Immunol*, 2005. 42(4): p. 459-62.
41. Long, E.O., D.F. Barber, D.N. Burshtyn, M. Faure, M. Peterson, S. Rajagopalan, V. Renard, M. Sandusky, C.C. Stebbins, N. Wagtmann, and C. Watzl, *Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158)*. *Immunol Rev*, 2001. 181: p. 223-33.
42. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(10): p. 781-90.
43. Mistry, A.R. and C.A. O'Callaghan, *Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D*. *Immunology*, 2007. 121(4): p. 439-47.
44. Marr, K.J., G.J. Jones, C. Zheng, S.M. Huston, M. Timm-McCann, A. Islam, B.M. Berenger, L.L. Ma, J.C. Wiseman, and C.H. Mody, *Cryptococcus neoformans directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity*. *Infect Immun*, 2009. 77(6): p. 2436-46.

45. Ma, L.L., C.L. Wang, G.G. Neely, S. Epelman, A.M. Krensky, and C.H. Mody, *NK cells use perforin rather than granulysin for anticytotoxic activity*. J Immunol, 2004. 173(5): p. 3357-65.
46. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(5): p. 361-70.
47. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(6): p. 401-9.
48. Lieberman, J. and Z. Fan, *Nuclear war: the granzyme A-bomb*. Curr Opin Immunol, 2003. 15(5): p. 553-9.
49. Stenger, S. and R.L. Modlin, *Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens*. Curr Opin Immunol, 1998. 10(4): p. 471-7.
50. Deng, A., S. Chen, Q. Li, S.C. Lyu, C. Clayberger, and A.M. Krensky, *Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator*. J Immunol, 2005. 174(9): p. 5243-8.
51. Zheng, C.F., L.L. Ma, G.J. Jones, M.J. Gill, A.M. Krensky, P. Kubes, and C.H. Mody, *Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill Cryptococcus neoformans, and activation of this pathway is defective in HIV patients*. Blood, 2007. 109(5): p. 2049-57.
52. Krensky, A.M. and C. Clayberger, *Biology and clinical relevance of granulysin*. Tissue Antigens, 2009. 73(3): p. 193-8.
53. Clayberger, C. and A.M. Krensky, *Granulysin*. Curr Opin Immunol, 2003. 15(5): p. 560-5.
54. Kumar, J., S. Okada, C. Clayberger, and A.M. Krensky, *Granulysin: a novel antimicrobial*. Expert Opin Investig Drugs, 2001. 10(2): p. 321-9.



55. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, and R.L. Modlin, *CTL-mediated killing of intracellular Mycobacterium tuberculosis is independent of target cell nuclear apoptosis*. J Immunol, 2000. 165(10): p. 5773-9.
56. van Pinxteren, L.A., J.P. Cassidy, B.H. Smedegaard, E.M. Agger, and P. Andersen, *Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells*. Eur J Immunol, 2000. 30(12): p. 3689-98.
57. Zhou, P., B.L. Freidag, C.C. Caldwell, and R.A. Seder, *Perforin is required for primary immunity to Histoplasma capsulatum*. J Immunol, 2001. 166(3): p. 1968-74.
58. Ma, L.L., J.C. Spurrell, J.F. Wang, G.G. Neely, S. Epelman, A.M. Krensky, and C.H. Mody, *CD8 T cell-mediated killing of Cryptococcus neoformans requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15*. J Immunol, 2002. 169(10): p. 5787-95.
59. Wang, X., P. Lupardus, S.L. Laporte, and K.C. Garcia, *Structural biology of shared cytokine receptors*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 29-60.
60. Liu, C.C., B. Perussia, and J.D. Young, *The emerging role of IL-15 in NK-cell development*. Immunol Today, 2000. 21(3): p. 113-6.
61. Ma, A., D.L. Boone, and J.P. Lodolce, *The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all*. J Exp Med, 2000. 191(5): p. 753-6.
62. Liu, K., M. Catalfamo, Y. Li, P.A. Henkart, and N.P. Weng, *IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(9): p. 6192-7.

63. Mody, C.H., J.C. Spurrell, and C.J. Wood, *Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by Cryptococcus neoformans-stimulated monocytes*. J Infect Dis, 1998. 178(3): p. 803-14.
64. Szczepanski, M.J., M. Szajnik, A. Welsh, K.A. Foon, T.L. Whiteside, and M. Boyiadzis, *Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors*. Cancer Immunol Immunother, 2009.
65. Huntington, N.D., N. Legrand, N.L. Alves, B. Jaron, K. Weijer, A. Plet, E. Corcuff, E. Mortier, Y. Jacques, H. Spits, and J.P. Di Santo, *IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo*. J Exp Med, 2009. 206(1): p. 25-34.
66. Choi, S.S., V.S. Chhabra, Q.H. Nguyen, B.J. Ank, E.R. Stiehm, and R.L. Roberts, *Interleukin-15 enhances cytotoxicity, receptor expression, and expansion of neonatal natural killer cells in long-term culture*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. 11(5): p. 879-88.
67. Ranson, T., C.A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, V. Laloux, A. Lehuen, and J.P. Di Santo, *IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5): p. 2663-8.
68. Tran, P., R. Ahmad, J. Xu, A. Ahmad, and J. Menezes, *Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity*. Immunology, 2003. 109(2): p. 263-70.

69. Fehniger, T.A., M.H. Shah, M.J. Turner, J.B. VanDeusen, S.P. Whitman, M.A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid, and M.A. Caligiuri, *Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response*. J Immunol, 1999. 162(8): p. 4511-20.
70. Forman, H.J. and M. Torres, *Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 166(12 Pt 2): p. S4-8.
71. Marcenaro, E., M. Della Chiesa, S. Pesce, S. Agaogue, and A. Moretta, *The NK/DC complot*. Adv Exp Med Biol, 2009. 633: p. 7-16.
72. Hardy, M.Y., A.J. Kassianos, A. Vulink, R. Wilkinson, S.L. Jongbloed, D.N. Hart, and K.J. Radford, *NK cells enhance the induction of CTL responses by IL-15 monocyte-derived dendritic cells*. Immunol Cell Biol, 2009.
73. Agaogue, S., E. Marcenaro, B. Ferranti, L. Moretta, and A. Moretta, *Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2008. 112(5): p. 1776-83.
74. Moreira, A.P., L.A. Dias-Melicio, M.T. Peracoli, S.A. Calvi, and A.M. Victoriano de Campos Soares, *Killing of Paracoccidioides brasiliensis yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms*. Mycopathologia, 2008. 166(1): p. 17-23.

75. Rodrigues, D.R., L.A. Dias-Melicio, S.A. Calvi, M.T. Peracoli, and A.M. Soares, *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol*, 2007. 45(1): p. 27-33.
76. Souto, J.T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M.A. Rossi, and J.S. Silva, *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*, 2000. 156(5): p. 1811-20.
77. Karhawi, A.S., A.L. Colombo, and R. Salomao, *Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission*. *Med Mycol*, 2000. 38(3): p. 225-9.
78. Brummer, E., L.H. Hanson, and D.A. Stevens, *Gamma-interferon activation of macrophages for killing of Paracoccidioides brasiliensis and evidence for nonoxidative mechanisms*. *Int J Immunopharmacol*, 1988. 10(8): p. 945-52.
79. Jimenez, B.E. and J.W. Murphy, *In vitro effects of natural killer cells against Paracoccidioides brasiliensis yeast phase*. *Infect Immun*, 1984. 46(2): p. 552-8.
80. Peracoli, M.T., A.M. Soares, R.P. Mendes, S.A. Marques, P.C. Pereira, and M.T. Rezkallah-Iwasso, *Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis*. *J Med Vet Mycol*, 1991. 29(6): p. 373-80.
81. Peracoli, M.T., M.R. Fortes, M.F. Da Silva, and M.R. Montenegro, *Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1995. 37(2): p. 129-36.

82. Murphy, J.W., *Natural killer cells and Cryptococcus neoformans*. Adv Exp Med Biol, 1993. 335: p. 269-75.
83. Murphy, J.W., M.R. Hidore, and N. Nabavi, *Binding interactions of murine natural killer cells with the fungal target Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1991. 59(4): p. 1476-88.
84. Hidore, M.R., N. Nabavi, F. Sonleitner, and J.W. Murphy, *Murine natural killer cells are fungicidal to Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1991. 59(5): p. 1747-54.
85. Lipscomb, M.F., T. Alvarellos, G.B. Toews, R. Tompkins, Z. Evans, G. Koo, and V. Kumar, *Role of natural killer cells in resistance to Cryptococcus neoformans infections in mice*. Am J Pathol, 1987. 128(2): p. 354-61.
86. Kawakami, K., Y. Koguchi, M.H. Qureshi, S. Yara, Y. Kinjo, K. Uezu, and A. Saito, *NK cells eliminate Cryptococcus neoformans by potentiating the fungicidal activity of macrophages rather than by directly killing them upon stimulation with IL-12 and IL-18*. Microbiol Immunol, 2000. 44(12): p. 1043-50.
87. Levitz, S.M., M.P. Dupont, and E.H. Smail, *Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1994. 62(1): p. 194-202.
88. Levitz, S.M., E.A. North, M.P. Dupont, and T.S. Harrison, *Mechanisms of inhibition of Cryptococcus neoformans by human lymphocytes*. Infect Immun, 1995. 63(9): p. 3550-4.

89. Levitz, S.M., H.L. Mathews, and J.W. Murphy, *Direct antimicrobial activity of T cells*. Immunol Today, 1995. 16(8): p. 387-91.
90. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
91. Ogawa, K., Y. Takamori, K. Suzuki, M. Nagasawa, S. Takano, Y. Kasahara, Y. Nakamura, S. Kondo, K. Sugamura, M. Nakamura, and K. Nagata, *Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity*. Eur J Immunol, 2003. 33(7): p. 1925-33.
92. Sahiratmadja, E., B. Alisjahbana, S. Buccheri, D. Di Liberto, T. de Boer, I. Adnan, R. van Crevel, M.R. Klein, K.E. van Meijgaarden, R.H. Nelwan, E. van de Vosse, F. Dieli, and T.H. Ottenhoff, *Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults*. Tuberculosis (Edinb), 2007. 87(4): p. 312-21.
93. Stegelmann, F., M. Bastian, K. Swoboda, R. Bhat, V. Kiessler, A.M. Krensky, M. Roellinghoff, R.L. Modlin, and S. Stenger, *Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2005. 175(11): p. 7474-83.
94. Aguilar, P., C.P. Mathieu, G. Clerc, G. Ethevenot, M. Fajraoui, S. Mattei, G.C. Faure, and M.C. Bene, *Modulation of natural killer (NK) receptors on NK (CD3-/CD56+), T (CD3+/CD56-) and NKT-like (CD3+/CD56+) cells*

- after heart transplantation. J Heart Lung Transplant, 2006. 25(2): p. 200-5.*
95. Trotta, R., J.D. Col, J. Yu, D. Ciarlariello, B. Thomas, X. Zhang, J. Allard, 2nd, M. Wei, H. Mao, J.C. Byrd, D. Perrotti, and M.A. Caligiuri, *TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. J Immunol, 2008. 181(6): p. 3784-92.*
96. Laouar, Y., F.S. Sutterwala, L. Gorelik, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. Nat Immunol, 2005. 6(6): p. 600-7.*
97. Scott, M.J., J.J. Hoth, M. Turina, D.R. Woods, and W.G. Cheadle, *Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. Cytokine, 2006. 33(2): p. 79-86.*
98. D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri, *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med, 1993. 178(3): p. 1041-8.*
99. Krensky, A.M. and C. Clayberger, *Granulysin: a novel host defense molecule. Am J Transplant, 2005. 5(8): p. 1789-92.*
100. Pena, S.V. and A.M. Krensky, *Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. Semin Immunol, 1997. 9(2): p. 117-25.*

101. Ochoa, M.T., S. Stenger, P.A. Sieling, S. Thoma-Uszynski, S. Sabet, S. Cho, A.M. Krensky, M. Rollinghoff, E. Nunes Sarno, A.E. Burdick, T.H. Rea, and R.L. Modlin, *T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy*. Nat Med, 2001. 7(2): p. 174-9.
102. Burlandy-Soares, L.C., R.L. Mamoni, L. Lyra, A.Z. Schreiber, and M.H. Blotta, *Expression of activation and cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes of patients with paracoccidioidomycosis*. Med Mycol.
103. Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo, *Paracoccidioidomycosis: an update*. Clin Microbiol Rev, 1993. 6(2): p. 89-117.
104. San-Blas, G., *Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res, 1993. 24(3): p. 267-8.
105. Silva, C.L., L.M. Alves, and F. Figueiredo, *Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiology, 1994. 140 ( Pt 5): p. 1189-94.
106. Akramiene, D., A. Kondrotas, J. Didziapetriene, and E. Kevelaitis, *Effects of beta-glucans on the immune system*. Medicina (Kaunas), 2007. 43(8): p. 597-606.
107. Neves, P.C., D.C. Matos, R. Marcovitz, and R. Galler, *TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination*. Vaccine, 2009. 27(41): p. 5543-9.
108. Duluc, D., F. Tan, M. Scotet, S. Blanchard, I. Fremaux, E. Garo, B. Horvat, P. Eid, Y. Delneste, and P. Jeannin, *PolyI:C plus IL-2 or IL-12*



- induce IFN-gamma production by human NK cells via autocrine IFN-beta.*  
Eur J Immunol, 2009. 39(10): p. 2877-84.
109. Marcenaro, E., B. Ferranti, M. Falco, L. Moretta, and A. Moretta, *Human NK cells directly recognize Mycobacterium bovis via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC.* Int Immunol, 2008. 20(9): p. 1155-67.
110. Szomolanyi-Tsuda, E., X. Liang, R.M. Welsh, E.A. Kurt-Jones, and R.W. Finberg, *Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo.* J Virol, 2006. 80(9): p. 4286-91.
111. Lauzon, N.M., F. Mian, R. MacKenzie, and A.A. Ashkar, *The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity.* Cell Immunol, 2006. 241(2): p. 102-12.
112. Hart, O.M., V. Athie-Morales, G.M. O'Connor, and C.M. Gardiner, *TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production.* J Immunol, 2005. 175(3): p. 1636-42.
113. Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R.A. Flavell, and B. Beutler, *Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(10): p. 3516-21.
114. Martinez, J., X. Huang, and Y. Yang, *Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection.* PLoS Pathog, 2010 6(3): p. e1000811.

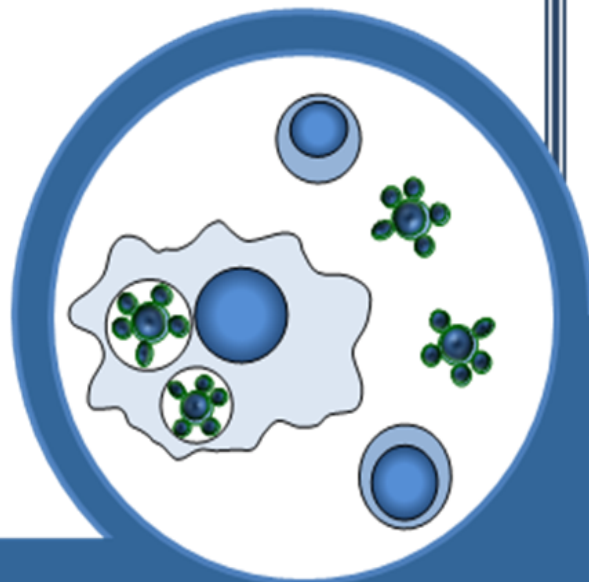
115. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(1): p. 33-43.
116. Ross, G.D. and V. Vetvicka, *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 1993. 92(2): p. 181-4.
117. Vetvicka, V., M. Hanikyrova, J. Vetvickova, and G.D. Ross, *Regulation of CR3 (CD11b/CD18)-dependent natural killer (NK) cell cytotoxicity by tumour target cell MHC class I molecules*. Clin Exp Immunol, 1999. 115(2): p. 229-35.
118. Xia, Y., V. Vetvicka, J. Yan, M. Hanikyrova, T. Mayadas, and G.D. Ross, *The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells*. J Immunol, 1999. 162(4): p. 2281-90.
119. Musso, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, M. Puliti, S. Bulfone-Paus, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A.N. Ponzi, and R. Badolato, *Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells*. Infect Immun, 1998. 66(6): p. 2640-7.
120. Tavian, E.G., L.A. Dias-Melicio, M.J. Acorci, A.P. Graciani, M.T. Peracoli, and A.M. Soares, *Interleukin-15 increases Paracoccidioides brasiliensis killing by human neutrophils*. Cytokine, 2008. 41(1): p. 48-53.
121. Biassoni, R., *Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands*. Curr Protoc Immunol, 2009. Chapter 14: p. Unit 14 10.

122. Gardiner, C.M., L.A. Guethlein, H.G. Shilling, M. Pando, W.H. Carr, R. Rajalingam, C. Vilches, and P. Parham, *Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism*. J Immunol, 2001. 166(5): p. 2992-3001.
123. Thomas, R., E. Yamada, G. Alter, M.P. Martin, A.A. Bashirova, P.J. Norman, M. Altfeld, P. Parham, S.K. Anderson, D.W. McVicar, and M. Carrington, *Novel KIR3DL1 alleles and their expression levels on NK cells: convergent evolution of KIR3DL1 phenotype variation?* J Immunol, 2008. 180(10): p. 6743-50.
124. Fehniger, T.A., W.E. Carson, and M.A. Caligiuri, *Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production*. Transplant Proc, 1999. 31(3): p. 1476-8.
125. Moretta, A., *Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(12): p. 957-64.
126. Moretta, A., E. Marcenaro, S. Parolini, G. Ferlazzo, and L. Moretta, *NK cells at the interface between innate and adaptive immunity*. Cell Death Differ, 2008. 15(2): p. 226-33.
127. Long, E.O., *Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells*. Immunity, 2007. 26(4): p. 385-7.
128. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(6): p. 476-83.
129. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(3): p. 151-61.

130. Ferreira, K.S., K.R. Bastos, M. Russo, and S.R. Almeida, *Interaction between Paracoccidioides brasiliensis and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility*. J Infect Dis, 2007. 196(7): p. 1108-15.
131. Ferreira, K.S., J.D. Lopes, and S.R. Almeida, *Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis*. Immunol Lett, 2004. 94(1-2): p. 107-14.
132. Almeida, S.R. and J.D. Lopes, *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): p. 529-37.
133. Kamath, A.T., C.E. Sheasby, and D.F. Tough, *Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma*. J Immunol, 2005. 174(2): p. 767-76.



# *Apêndice*





## 8. APÊNDICE

### 8.1 Tabela descritiva dos pacientes e indivíduos do grupo controle

Tabela 8.1 – Descrição dos pacientes com doença ativa

Sexo	Idade (anos)	Órgão afetado	Forma Clínica
M	26	Linfonodo abdominal, Pulmões	FA
M	43	Pulmões, mucosa oral	FA
F	59	Pulmões, mucosa oral	FA
F	7	Óssos	FJ
M	12	Linfonodos	FJ
F	27	Linfonodos	FJ
F	33	Linfonodos	FJ
M	29	Pulmões, mucosa oral	FA
M	46	Pulmões, laringe	FA
M	57	Pulmões, mucosa oral	FA
M	55	Pulmões, pele, mucosa oral	FA
M	52	Pulmões, pele, mucosa oral	FA
M	54	Pulmões, mucosa oral	FA
M	48	Pulmões, laringe, mucosa nasal	FA
F	54	Pulmões, mucosa oral	FA
M	43	Pulmões, mucosa nasal, linfonodos	FA
M	61	Pulmões, mucosa oral	FA
F	49	Pulmões, mucosa oral	FA
F	17	Linfonodos, fígado	FJ
F	20	Linfonodos, fígado, baço	FJ
M	18	Linfonodos	FJ



Tabela 8.2 – Descrição dos pacientes tratados

<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Órgão afetado (no momento do diagnóstico)</b>	<b>Forma Clínica</b>
M	53	Pulmões, mucosa oral	FA
M	69	Pulmões, laringe	FA
F	43	pele, mucosa oral	FA
F	27	Linfonodos	FJ
M	24	Linfonodos	FJ

Tabela 8.3 – Descrição dos indivíduos do grupo controle

<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>
F	27
F	27
F	30
F	40
F	37
M	35
M	55
F	51
M	55
M	25
M	26
F	41
M	28
M	24
M	30
F	24

## 8.2 Termo de consentimento pós-informação

**Nome do Estudo:** Avaliação da participação das células NK (células CD56<sup>+</sup>) na resposta ao *Paracoccidioides brasiliensis*.

**Pesquisador Principal:** Larissa Nara Alegrini Longui

**Orientador:** Ronei Luciano Mamoni  
**Co-orientadora:** Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

**Local:** Hospital das Clínicas - Unicamp

Nome:

---

Idade: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

### **Contatos:**

**Larissa Nara Alegrini Longui** – (19) 3521-8991  
Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni – (19) 3521-8991  
Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta – (19) 3521-9453

### **Objetivos do Estudo:**

Nós pedimos a permissão de incluir o (a) senhor (a) como participante de um protocolo de pesquisa. O objetivo deste estudo é verificar a participação de um tipo de célula presente no sangue, denominadas células “Natural Killer” (NK) na infecção humana pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose (blastomicose sul americana). Este estudo permitirá compreender melhor os mecanismos envolvidos nessa doença e dessa forma encontrar melhores formas de tratamento e intervenção.

### **Procedimentos:**

Neste estudo colheremos uma amostra de sangue com a qual realizaremos todos os testes que necessitamos. Informamos que o material coletado, será totalmente aproveitado (plasma e células sanguíneas) para a realização das diferentes metodologias descritas no projeto de pesquisa.

### **Riscos e Desconfortos**

Nenhum risco maior ou desconforto ocorrerá devido ao estudo. A punção venosa ocorrerá como de costume e serão coletados 30mL de sangue. Como em qualquer coleta de sangue, durante o procedimento, poderá haver dor e/ou formação de hematoma no local da punção.

### **Recusa de Participação ou Retirada do Estudo**

A participação neste estudo é voluntária. Você não tem nenhuma obrigação de participar deste estudo. Se você decidir participar, você poderá mudar de opinião e sair do estudo a qualquer momento sem que isto afete seu tratamento atual ou futuro neste hospital.

### **Confidencialidade**

Informações médicas obtidas neste estudo farão parte de arquivo dos investigadores e identificado por códigos e quem tiver acesso a ele deverá manter a confidencialidade de acordo com as leis e políticas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Nenhuma informação será distribuída a pessoas não relacionadas à pesquisa sem seu consentimento prévio, a não ser em casos previstos neste termo de consentimento.

As informações poderão eventualmente serem disponibilizados a órgãos governamentais no cumprimento de seu dever legal de zelar pela ética na pesquisa médica.

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas ou livros médicos e serão usados para o ensino. Porém, seu nome e outros identificadores não serão usados em nenhum momento sem a sua devida permissão.

### **Requerimento de Maiores Informações**

Você pode fazer novas perguntas sobre o estudo a qualquer momento. Os investigadores vão dar a você números de telefone e estarão disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas.

Se durante o estudo ou após você desejar discutir seus direitos como participante do grupo de estudo, tiver qualquer reclamação ou se sentir pressionado para participar do estudo ou para continuar nele, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp no telefone (19) 3521-8936.

### **Assinatura:**

Eu confirmo que o objetivo do estudo, seus procedimentos e os possíveis riscos e desconfortos que eu possa experimentar foram explicados para mim. Alternativas a minha participação também foram discutidas. Todas as minhas questões foram respondidas. Li ou leram para mim este termo de consentimento. Minha assinatura abaixo indica minha inclusão no estudo.

_____	_____
Paciente	Data
_____	_____
Testemunha	Data

Eu atesto que expliquei o objetivo do estudo, seus procedimentos, identificando quais seriam investigativos, os possíveis riscos e desconfortos e respondi a todas as questões a respeito do estudo na melhor de minhas habilidades.

_____	_____
Representante do Estudo	Data

## 8.3 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 07/11/07.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 793/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0580.0.146.000-07

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS NK (CÉLULAS CD56+) NA RESPOSTA AO PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Ronei Luciano Mamoní

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas / UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 11/10/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 23/10/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Avaliar a capacidade fungicida e o mecanismo de ação citotóxica das células NK contra cepas avirulentas e virulentas do *P. brasiliensis*, bem como a atividade citotóxica das células NK sobre células alvo.

### III - SUMÁRIO

Os pesquisadores esclarecem que a paracoccidiodomicose é uma doença fúngica, endêmica em certas partes do Brasil, com duas formas clínicas, a adulta e a juvenil. Estudos prévios mostram diferentes reações imunológicas conforme o tipo da doença. Considerando que os estudos sobre a participação das células NK na infecção humana pelo *P. brasiliensis* ainda são bastante incipientes, o presente projeto pretende avaliar a resposta efetora desse tipo celular isolados de doadores normais e de células YT (linhas de células NK humanas) e leveduras de *P. brasiliensis*, sendo uma Pb18 (virulenta) e outra Pb265 (avirulenta). Serão incluídos no trabalho 30 indivíduos normais saudáveis que serão submetidos a coleta de sangue periférico, do qual serão extraídas as células NK. O fungo será obtido através de culturas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* da cepa virulenta e da cepa avirulenta. Os estudos serão realizados “in vitro” e incluem a determinação da atividade fungicida das células NK isoladas por contagem do número de unidades formadoras de colônia, teste de citotoxicidade avaliada por transwell, avaliação da resposta citotóxica contra células alvo (K562) infectadas por dosagem de LDH e avaliação da produção de IFN-gama por células NK expostas a leveduras de ambas as cepas por teste de ELISA do tipo sanduíche. Todos os experimentos serão realizados com grupos controle negativo (sem leveduras) e os resultados serão submetidos a estudo estatístico usando o método não paramétrico de Kruskal-Wallis e pelo método de Wilcoxon. É prevista duração de 24 meses para a realização do trabalho.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

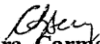
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

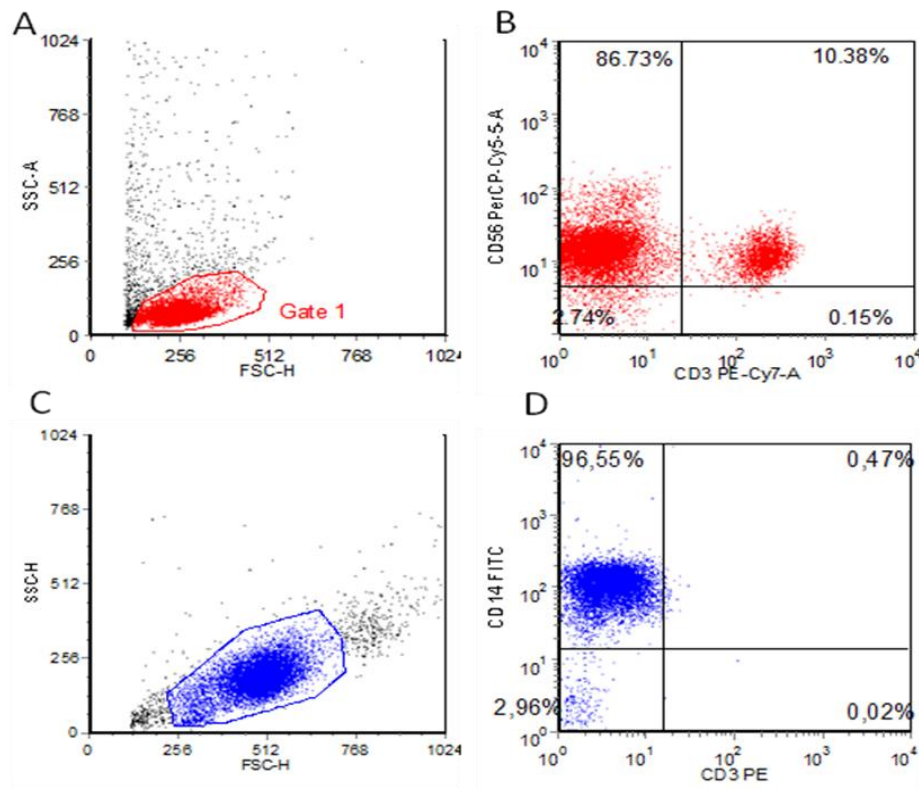
## VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2.007.

  
Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

#### 8.4 Análise da pureza de células CD56<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> obtidas de CMSP após separação imunomagnética

Após a separação imunomagnética obtivemos populações de células com pureza de 90 a 98%. Note que o isolamento de células CD56<sup>+</sup> por meio de anticorpos anti-CD56 resulta em duas populações distintas. Uma CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (células NK) e outra CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (células NKT). A população de células NKT variou entre 5 a 15% das células CD56<sup>+</sup> obtidas (figura 8.1).

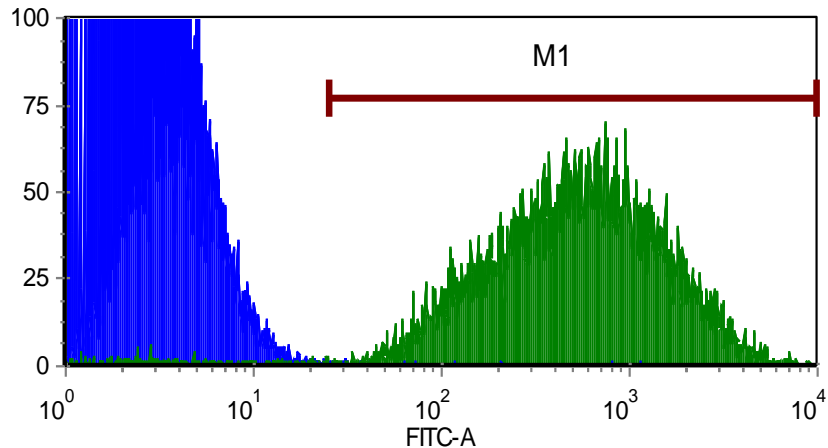


**Figura 8.1:** “Dot-plots” representativos da análise por citometria de fluxo da distribuição por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (A e C) de subpopulações celulares obtidas após separação imunomagnética de células CD56<sup>+</sup> (A) e CD14<sup>+</sup> (C) no qual foram feitos “gates” para a análise da composição celular com marcadores de superfície (B e D). Células após seleção imunomagnética positiva com anticorpos anti-CD56 (CD56<sup>+</sup> - B), e anti-CD14 (CD14<sup>+</sup> - D). Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas em cada quadrante.

## **8.5 Avaliação da infecção de células CD14<sup>+</sup> com leveduras de *P. brasiliensis* por citometria de fluxo.**

Com o intuito de avaliar a infecção de células CD14<sup>+</sup> por células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265), decidimos aplicar uma técnica de citometria de fluxo. Para isso foi utilizada a marcação das células fúngicas com CFSE. Células leveduriformes de ambas as cepas ( $1 \times 10^6$  células) foram incubadas com CFSE (concentração final de 5  $\mu$ M) por 5 minutos em 1 mL de PBS. Após o período de incubação foi adicionado nos tubos 2 mL de meio RPMI suplementado com soro humano AB (10%) para parar a reação. As leveduras foram então centrifugadas (1300 rpm por 10 minutos a 4°C) e ressuspendidas em PBS. Após 2 lavagens adicionais com PBS as células fúngicas marcadas foram incubadas com células CD14<sup>+</sup> (purificadas por separação imunomagnética) em uma razão de 50:1 (cinquenta células fúngicas para cada monócito), por 4 horas. Após o período de incubação as células foram coletadas centrifugadas, ressuspendidas em 200  $\mu$ L de formaldeído 2% e analisadas em citômetro de fluxo (FACScanto).

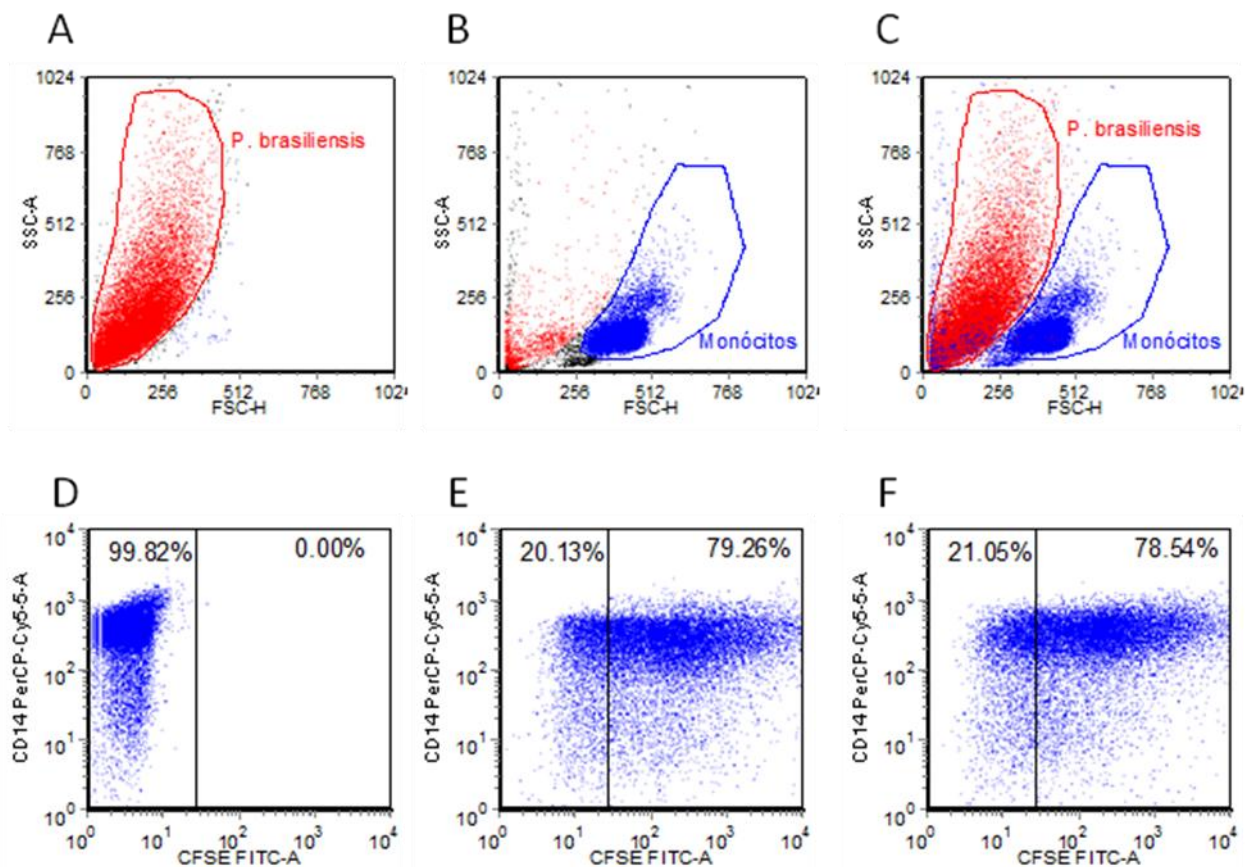
Conforme pode ser observado no histograma abaixo (figura 8.2) a marcação com CFSE foi eficaz para as células fúngicas.



**Figura 8.2** – Histograma representativo da marcação com CFSE das células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A curva em azul representa as células leveduriformes não marcadas e a curva em verde às células marcadas com CFSE.

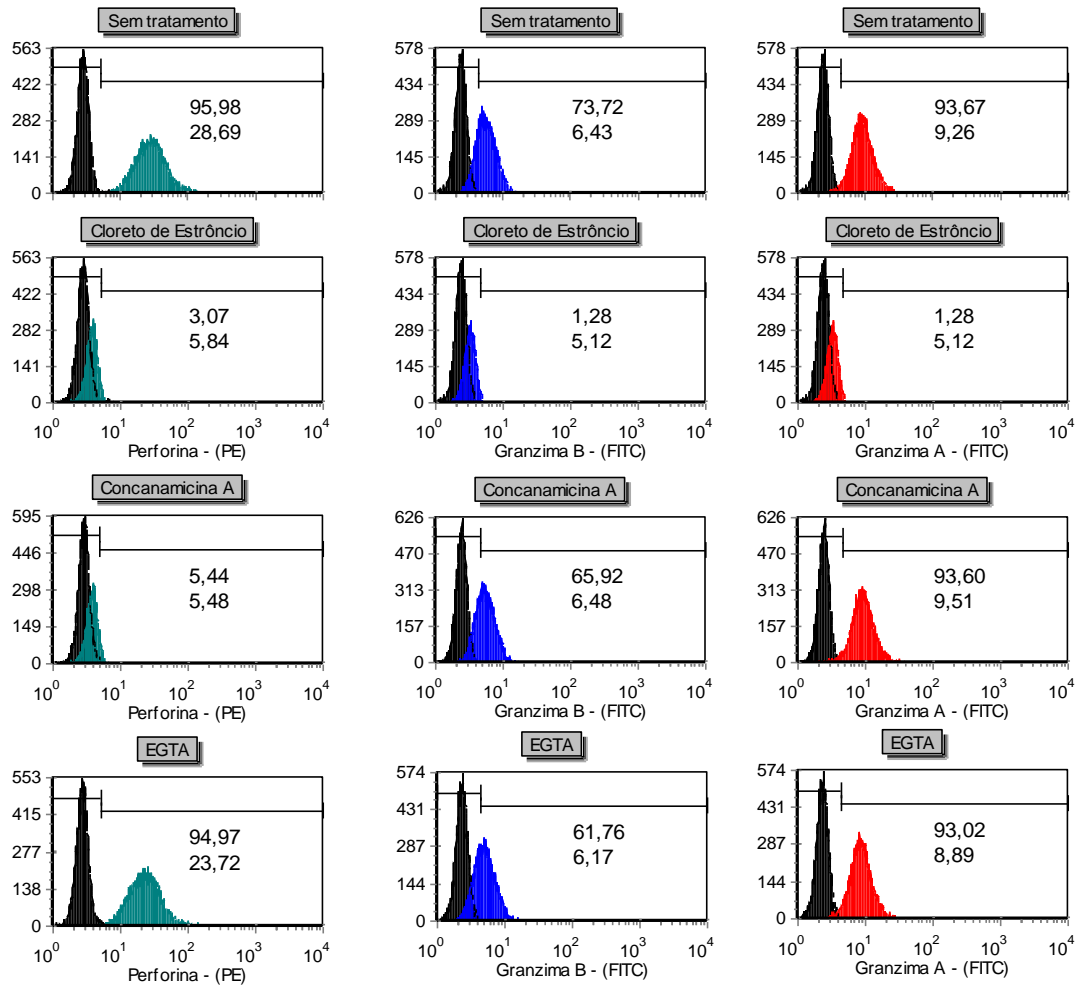
Na figura abaixo (figura 8.3) está descrita a forma de análise para avaliar a porcentagem de monócitos infectados. Em um primeiro momento foi definida, por tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC), a distribuição das células leveduriformes de *P. brasiliensis* e das células CD14<sup>+</sup> (monócitos). Como pode ser observado nas figuras 8.3A-C, as duas regiões não se sobrepõem, permitindo assim a análise. Após determinar a região dos monócitos, foram gerados novos gráficos (dot-plots 8.3D-F) nos quais foi analisada a porcentagem de monócitos marcados com CFSE (indicativo da infecção com leveduras marcadas). Os resultados mostraram que aproximadamente 80% dos monócitos foram infectados pelas células leveduriformes de *P. brasiliensis* de ambas as cepas testadas.





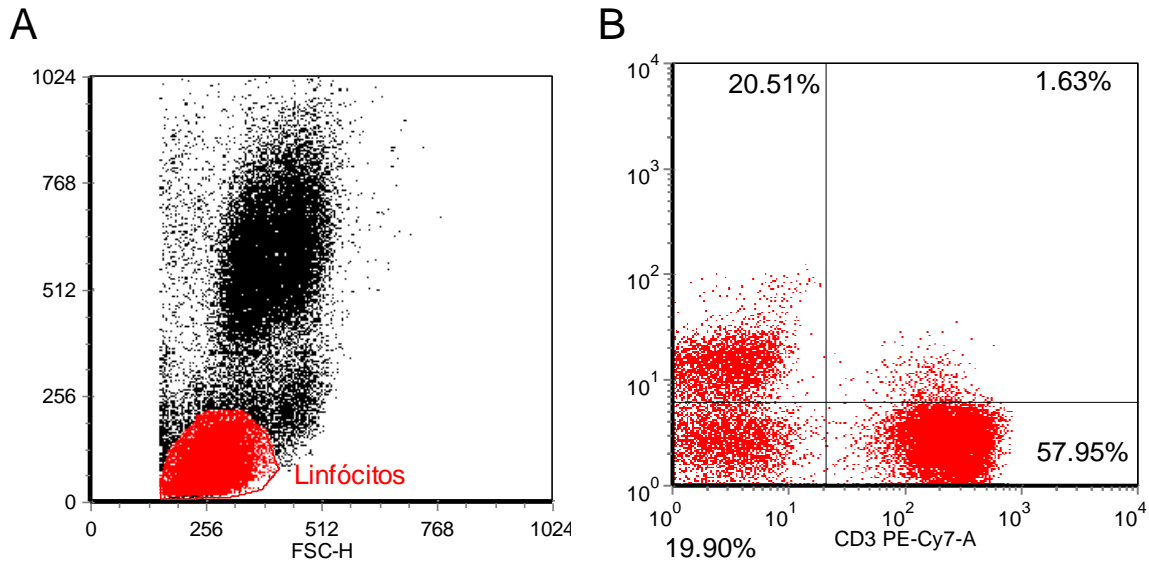
**Figura 8.3:** “Dot-plots” representativos da padronização da infecção de monócitos (células CD14<sup>+</sup>) por células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265). **A)** Determinação da distribuição por tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) de leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 (a cepa Pb265 apresenta distribuição semelhante – dado não mostrado). **B)** Determinação da distribuição por tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) das células CD14<sup>+</sup> (monócitos). Note que as duas populações ocupam regiões distintas **C)** permitindo a sua discriminação e delimitação. **D-F:** Dot-plots representativos da porcentagem de células CD14<sup>+</sup> marcadas com CFSE (quadrante direito). **D** – monócitos não expostos a células fúngicas. **E** e **F:** monócitos incubados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepa Pb18 – E e cepa Pb265 – F). Os números nos quadrantes representam a porcentagem de células.

## 8.6 Avaliação do efeito do tratamento das células CD56<sup>+</sup> com SrCl<sub>2</sub>, concanamicina e EGTA sobre a expressão dos componentes dos grânulos citotóxicos



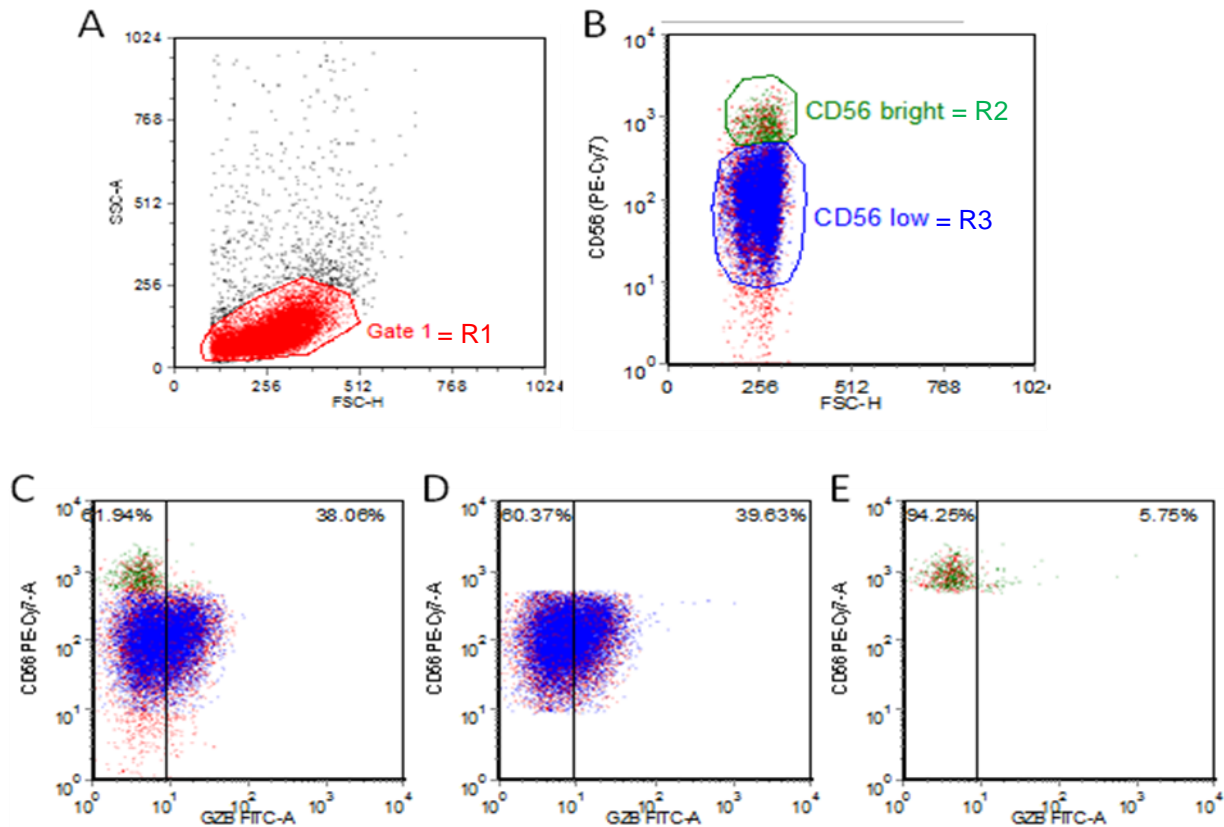
**Figura 8.4:** Histogramas representativos do resultado do tratamento de células CD56<sup>+</sup> por agentes que interferem com os componentes dos grânulos citotóxicos. Após a separação imunomagnética, CD56<sup>+</sup> foram mantidas sem tratamento, ou submetidas ao tratamento com cloreto de estrôncio (25mM – por 18 horas); concanamicina (10nM - por 2 horas) ou EGTA (4mM – por 18 horas). Após os tratamentos as células foram submetidas à imunofluorescência para marcação de superfície com anti-CD56 (FITC ou PE) e posterior marcação intracelular com anti-granzima A e B (FITC) ou perforina (PE), e analisadas em citômetro de fluxo. A região de células negativas foi delimitada utilizando a marcação com anticorpos controle de isotipo (em preto). Os números destacados nos gráficos representam a porcentagem de células positivas (número superior) e a intensidade média de fluorescência (número inferior).

**8.7 Estratégia utilizada para avaliar a porcentagem de células CD56<sup>+</sup> (NK e NKT) no sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos do grupo controle.**



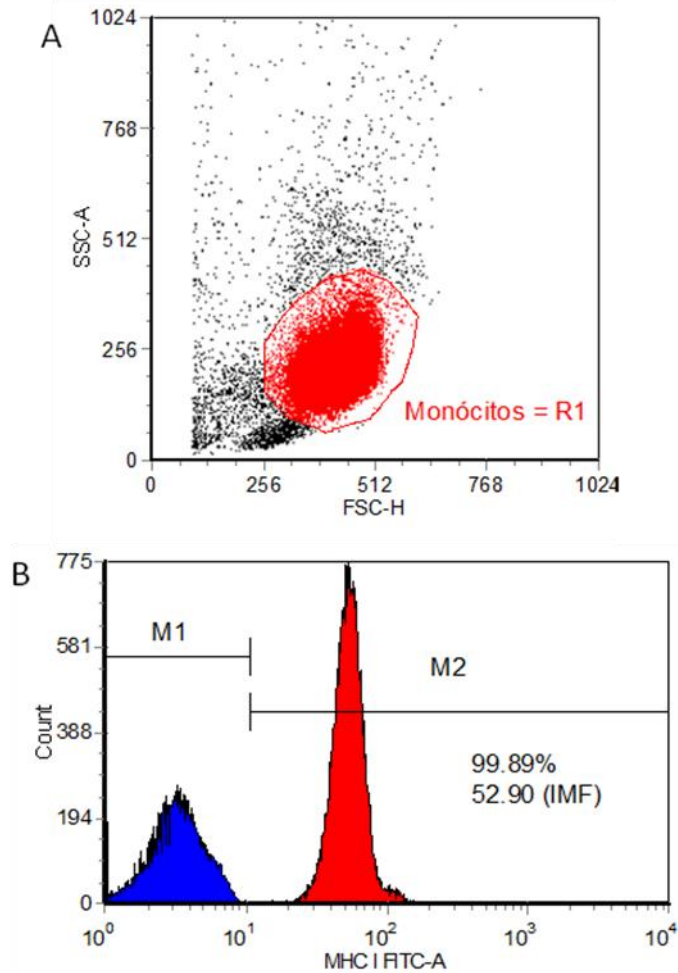
**Figura 8.5:** Estratégia utilizada para a determinação da porcentagem de células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (células NK) e CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (NKT) no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e indivíduos do grupo controle. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo “dot-plot”, no qual a população de linfócitos foi determinada de acordo com as suas características de dispersão quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (A), sendo então delimitada a região R1 (linfócitos). A partir desse gráfico foi gerado outro “dot-plot” no qual foi visualizada a marcação de células com os anticorpos anti-CD56 e anti-CD3 (B). Nesse gráfico foram então delimitadas as populações de células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (quadrante superior esquerdo) e CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (quadrante superior direito). Os resultados finais foram expressos como a porcentagem de células positivas para cada parâmetro (números destacados em cada quadrante).

**8.8 Estratégia utilizada para avaliar a porcentagem de células CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup> e CD56 total expressando diferentes parâmetros de superfície e intracelulares.**



**Figura 8.6:** Estratégia utilizada para a análise da expressão dos diversos parâmetros de superfície e intracelulares nas células CD56<sup>+</sup>. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo “dot-plot”, no qual a população de células foi determinada de acordo com as suas características de dispersão quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (A), sendo então delimitada a região R1 (gate 1). A partir desse gráfico foi gerado outro “dot-plot” no qual foi visualizada a marcação de células com os anticorpos anti-CD56 e o tamanho das células (FSC-H) (B). Nesse gráfico foram então delimitadas as populações de células CD56<sup>bright</sup> (R2 - em verde) e CD56<sup>dim</sup> (R3 - em azul). Para a análise final foram gerados novos gráficos a partir da região R1 (CD56<sup>+</sup> total – C) ou da combinação das regiões R1 e R3 (CD56<sup>dim</sup> – D) ou R1 e R2 (CD56<sup>bright</sup> – E), nos quais se analisou a expressão dos demais marcadores (na figura acima estão representados os resultados obtidos para expressão de granzima B (GZB). Os resultados finais foram expressos como a porcentagem de células positivas para cada parâmetro (números destacadas no quadrante direito).

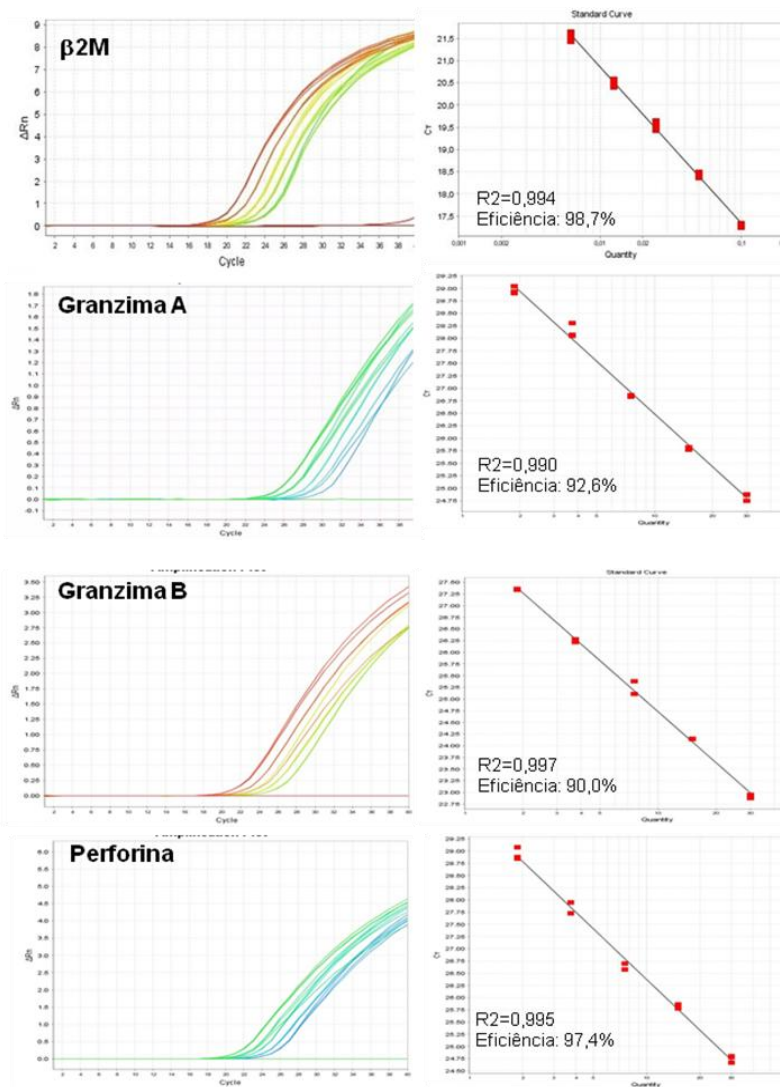
## 8.9 Estratégia utilizada para avaliar expressão de moléculas de superfície em monócitos.

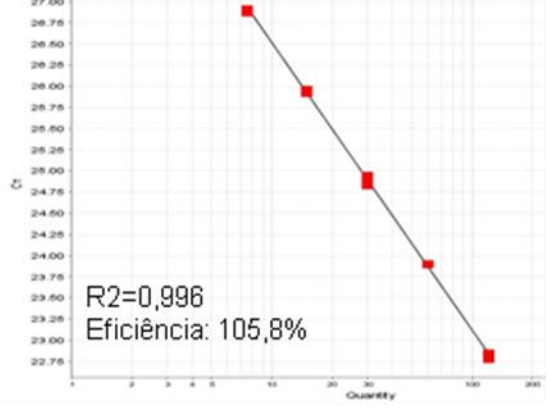
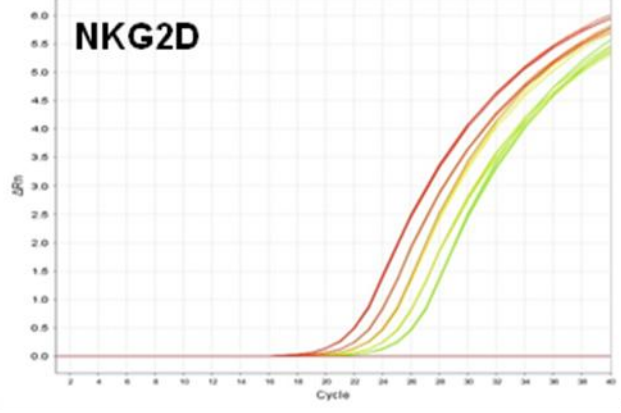
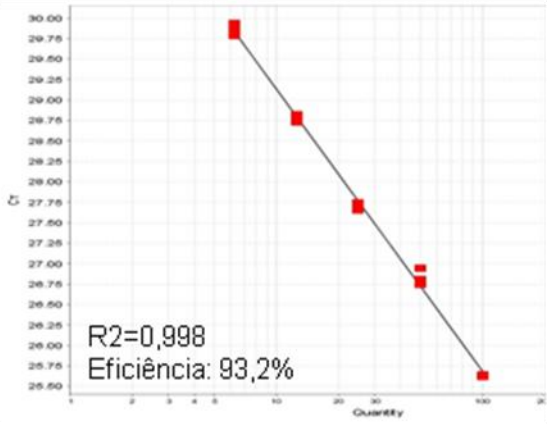
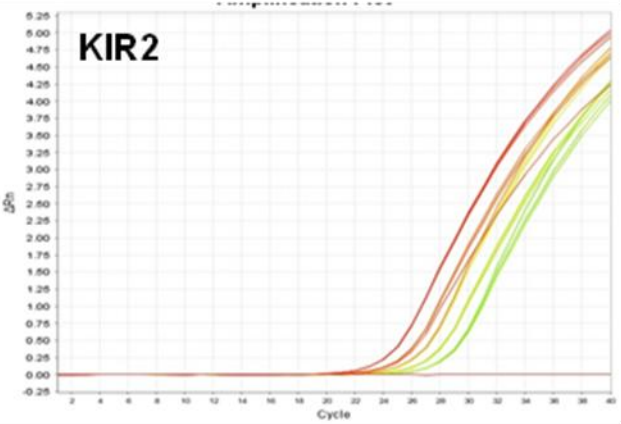
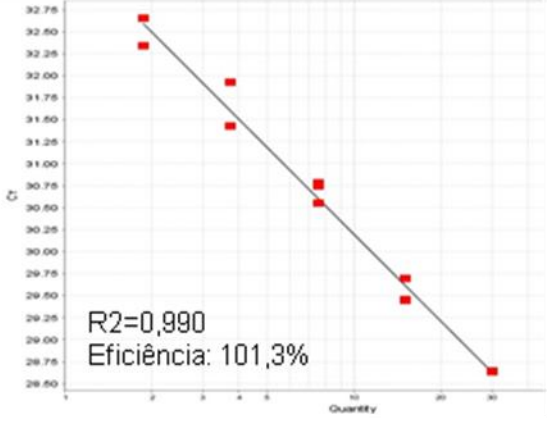
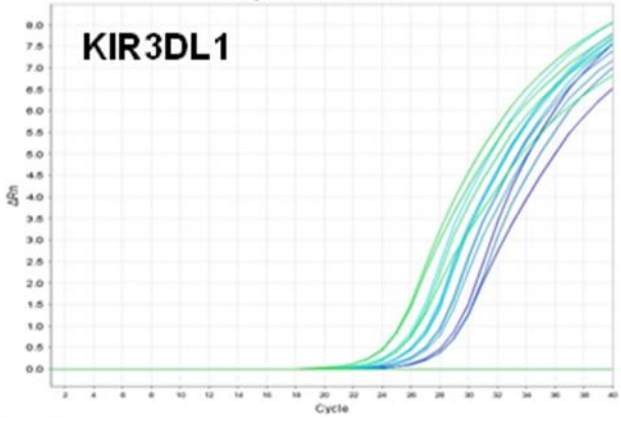
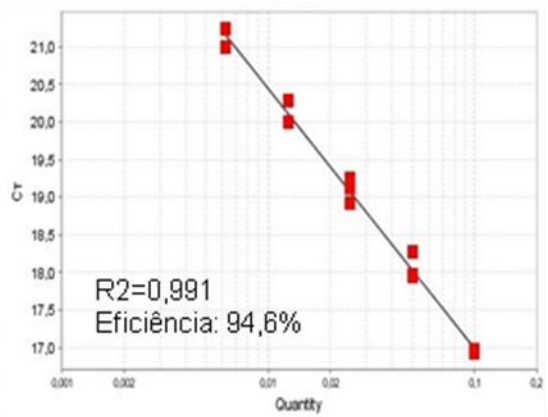
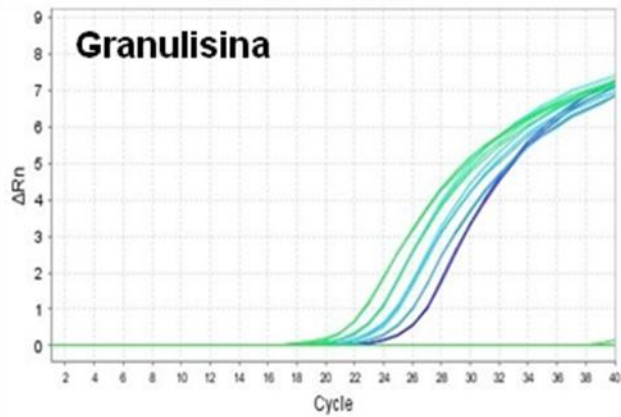


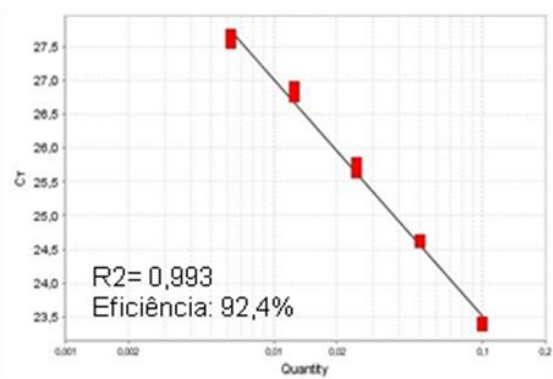
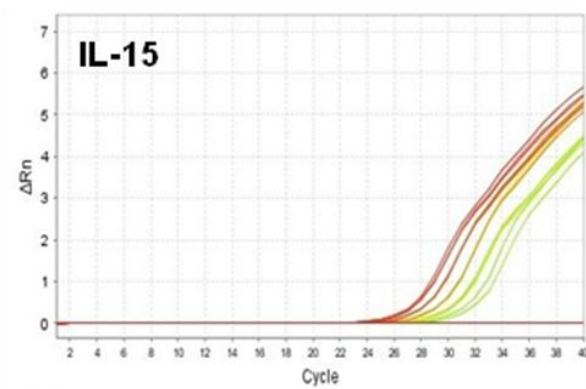
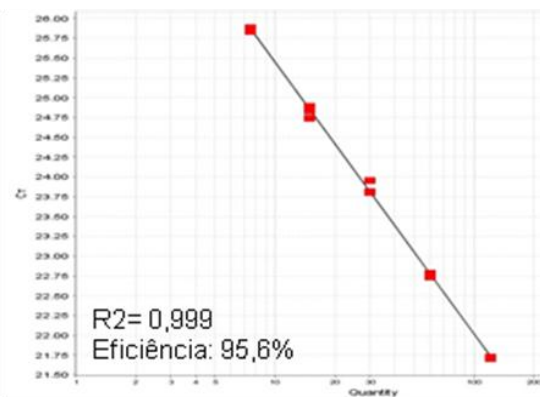
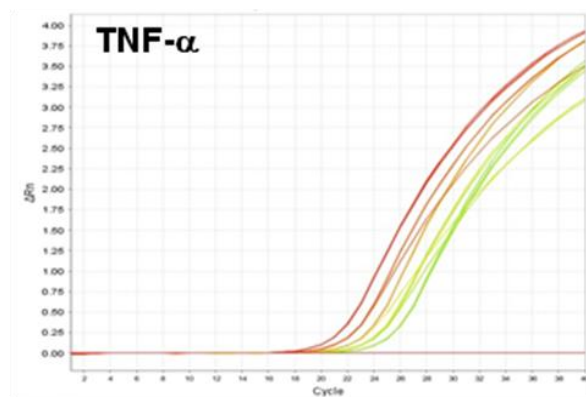
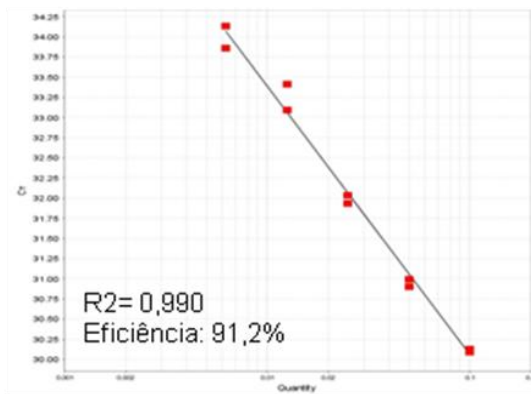
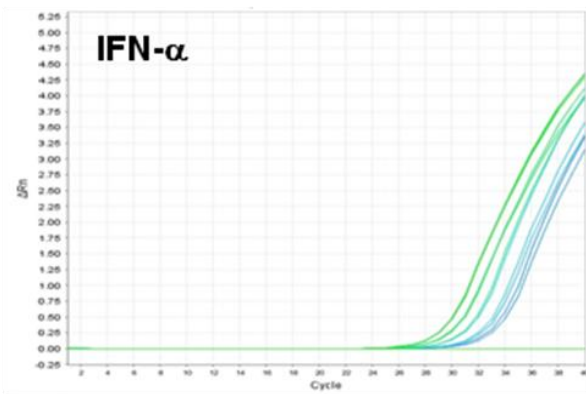
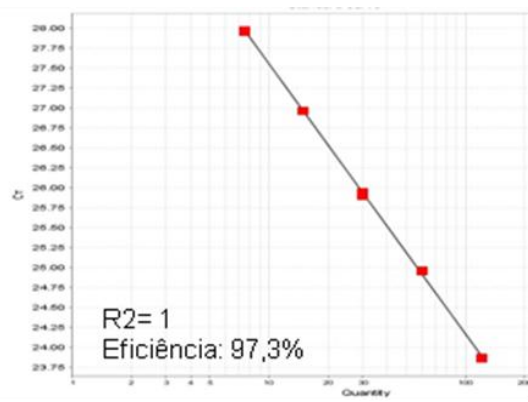
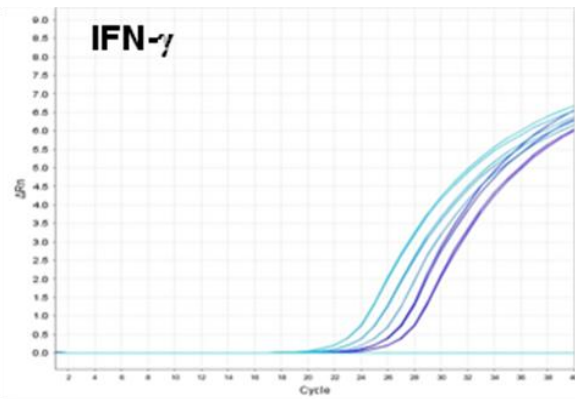
**Figura 8.7:** Estratégia utilizada para a análise da expressão dos diversos parâmetros de superfície nas células CD14<sup>+</sup>. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo “dot-plot”, no qual a população de células foi determinada de acordo com as suas características de dispersão quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (A), sendo então delimitada a região **R1** (monócitos). A partir desse gráfico foram gerados histogramas onde cada parâmetro foi analisado (B). No histograma foram delimitadas regiões negativas e positivas para cada parâmetro (**M1** e **M2** respectivamente) tendo como base a fluorescência do controle de isotipo de cada fluorocromo (em azul), sendo então analisada a porcentagem de células positivas e a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada parâmetro (números destacados no histograma). Na figura acima estão representados os resultados obtidos para expressão de MHC de classe I.

## 8.10 Determinação da eficiência e especificidade de amplificação dos primers utilizados na técnica de qRT-PCR

Os resultados da padronização do qRT-PCR para os RNAm analisados estão demonstrados nas figuras abaixo, onde é possível observar a eficiência da reação de amplificação (figura 8.8) e a curva de "melting" das reações (figura 8.9), nas quais foram utilizadas os "primers" para  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ M), Granzima A, Granzima B, Perforina, Granulinsina, KIR3DL1, KIR2, NKG2D, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-15.

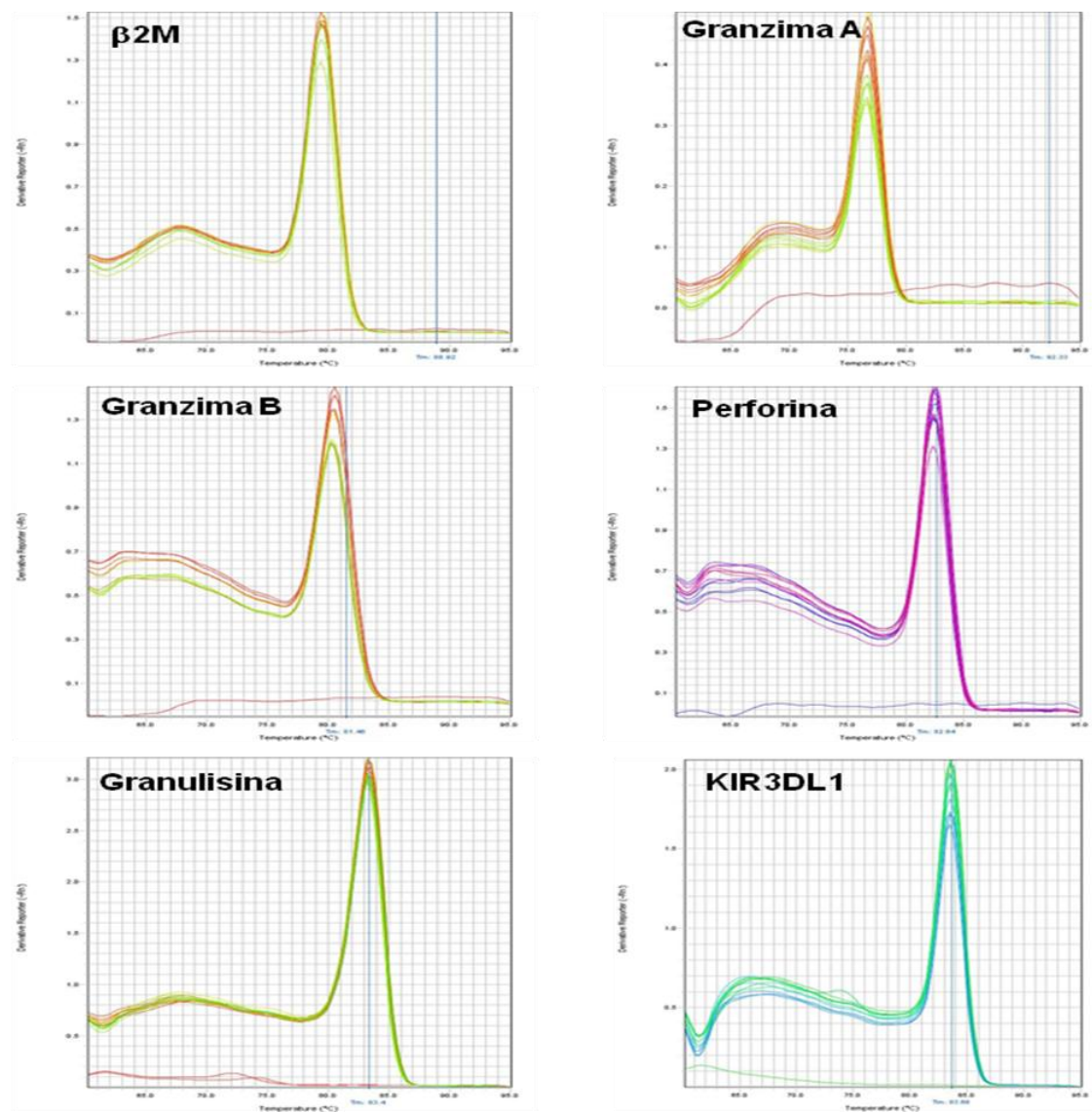


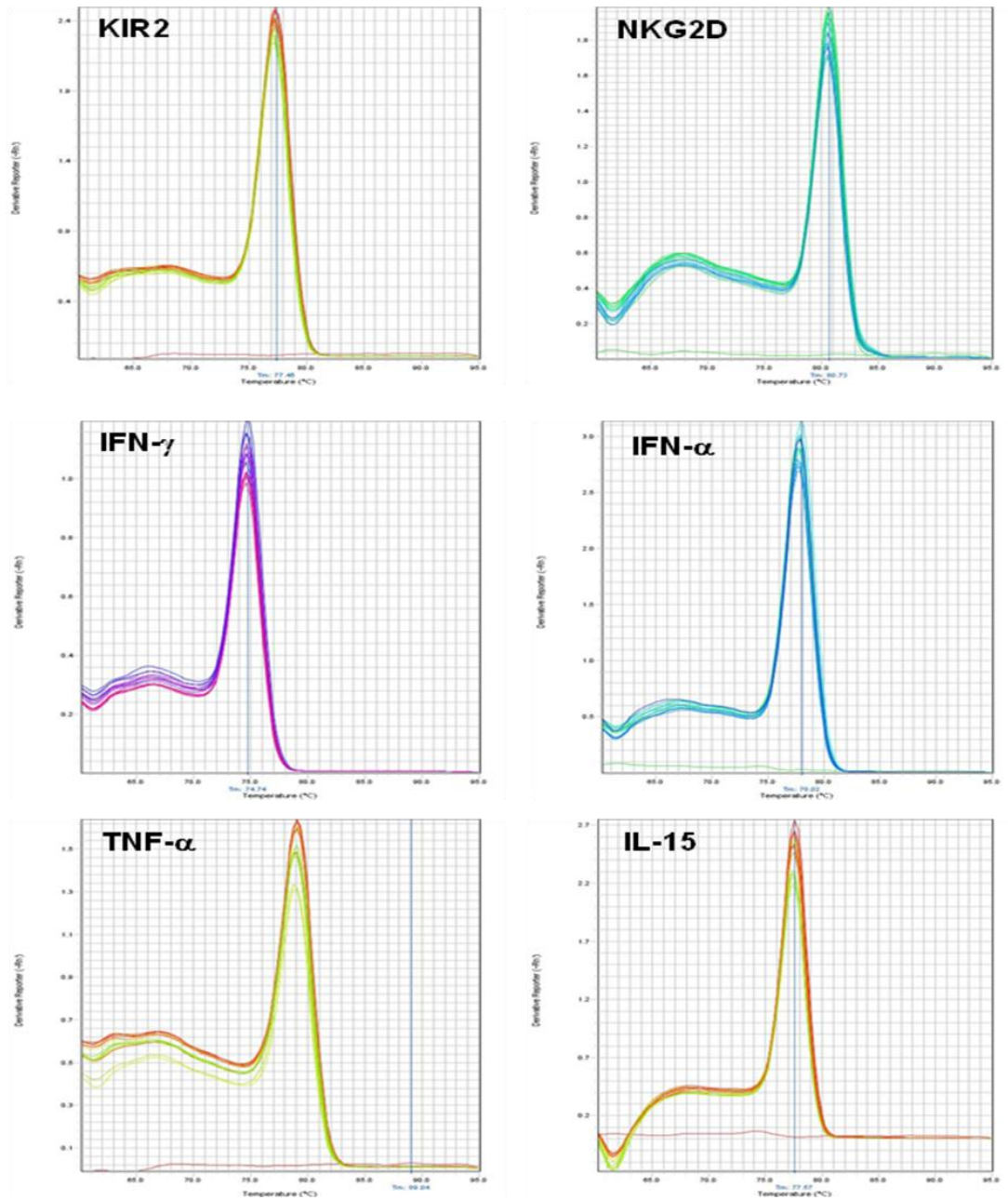






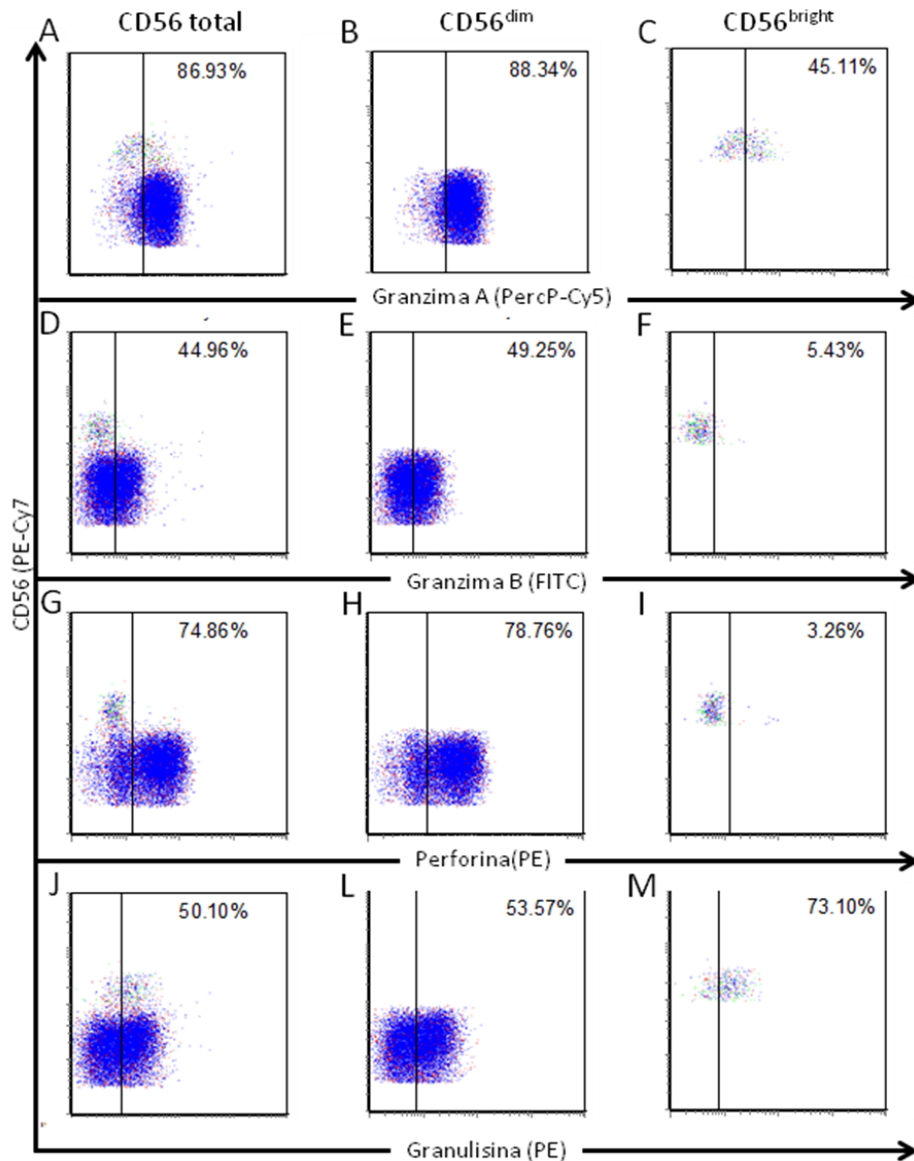
**Figura 8.8 (páginas anteriores):** Gráficos de amplificação (esquerda) e curva-padrão (direita) resultados da padronização da eficiência das reações de qRT-PCR para quantificação do RNAm para  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ M), Granzima A, Granzima B, Perforina, Granulicina, KIR3DL1, KIR2, NKG2D, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-15. Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA (300ng / reação) e a seguir de forma seriada na proporção de 1:2 (5 pontos). Os gráficos demonstram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras (lado esquerdo), por meio do qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos CTs em função da diluição da amostra (direita). Os valores de  $R^2$  e da eficiência da reação estão destacados em cada gráfico.



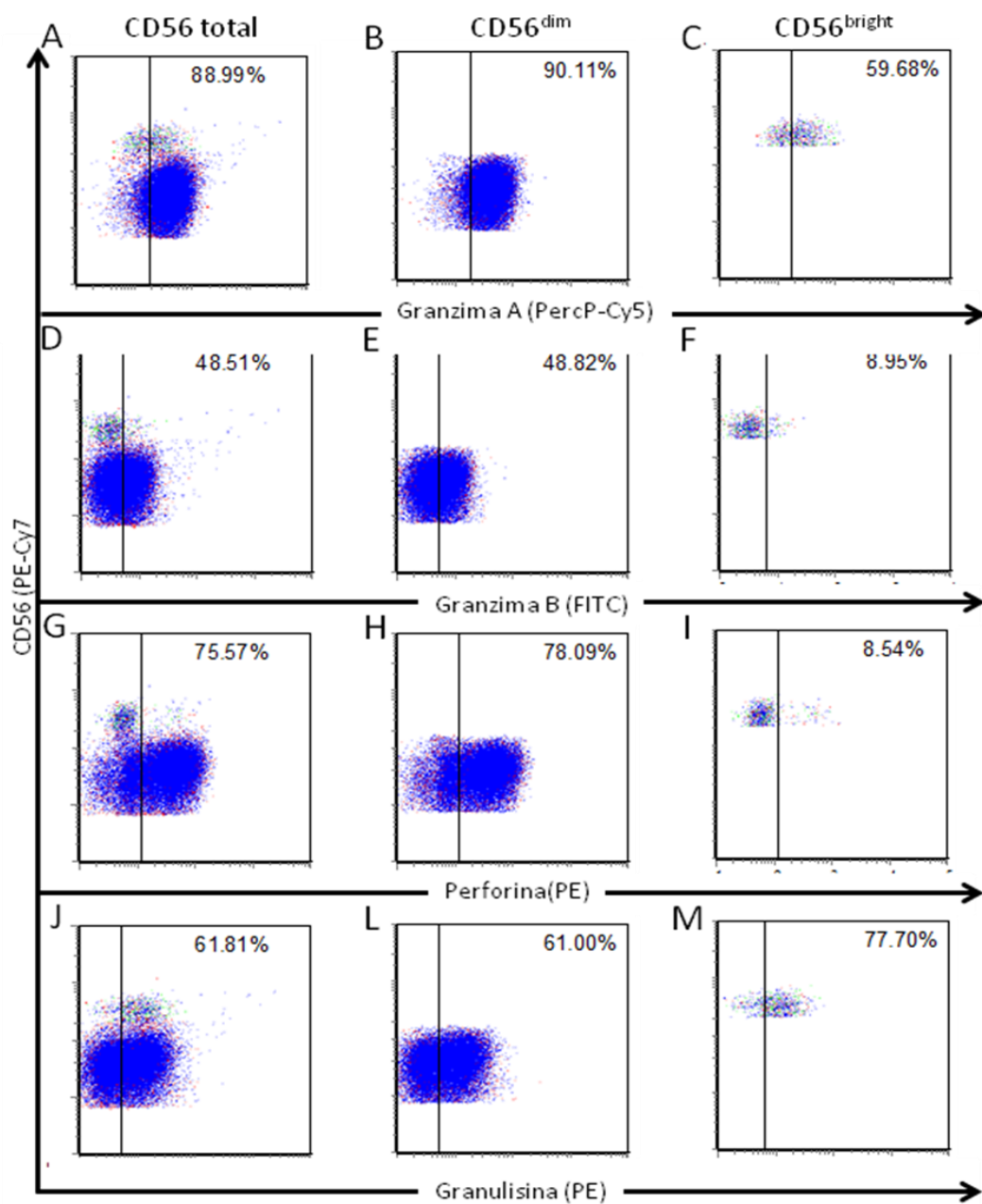


**Figura 8.9 (páginas anteriores):** Curvas de “melting” representativas de resultados obtidos em equipamento de PCR em tempo real, após a realização de testes de amplificação do RNAm para  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ M), Granzima A, Granzima B, Perforina, Granulinsina, KIR3DL1, KIR2, NKG2D, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-15. É possível observar que a reação utilizando os “primers” na concentração descrita é específica, uma vez que todas as amostras testadas apresentam temperatura de “melting” (T<sub>m</sub>) idênticas.

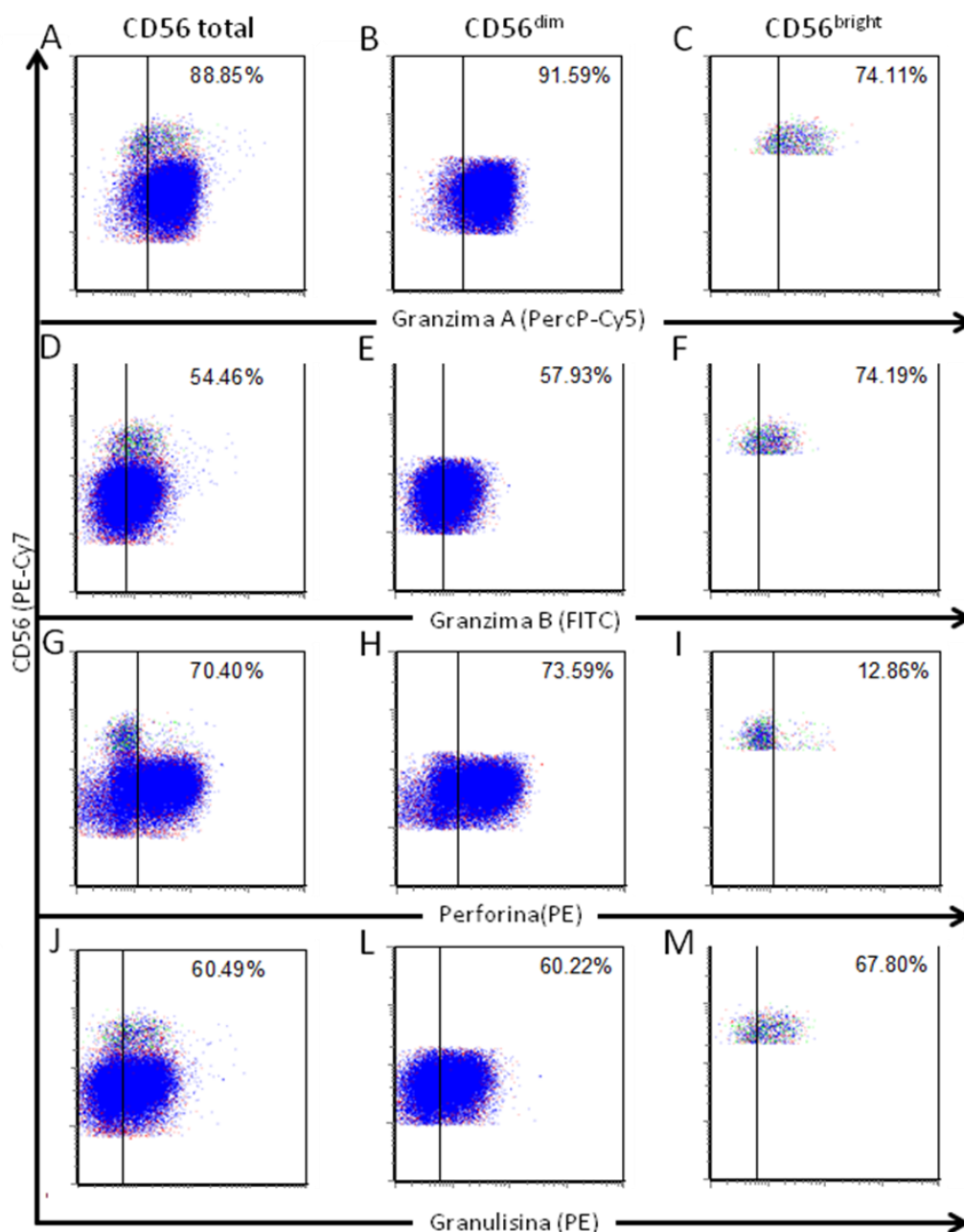
**8.11 “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos por células CD56<sup>+</sup>**



**Figura 8.10:** “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos em células CD56<sup>+</sup> não estimuladas provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose. Granzima A (A-C), Granzima B (D-F), Perforina (G-I) e granulisina (J-M) em células CD56<sup>+</sup>. Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D, G e J), células CD56<sup>dim</sup> (B, E, H e L) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F, I e M) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

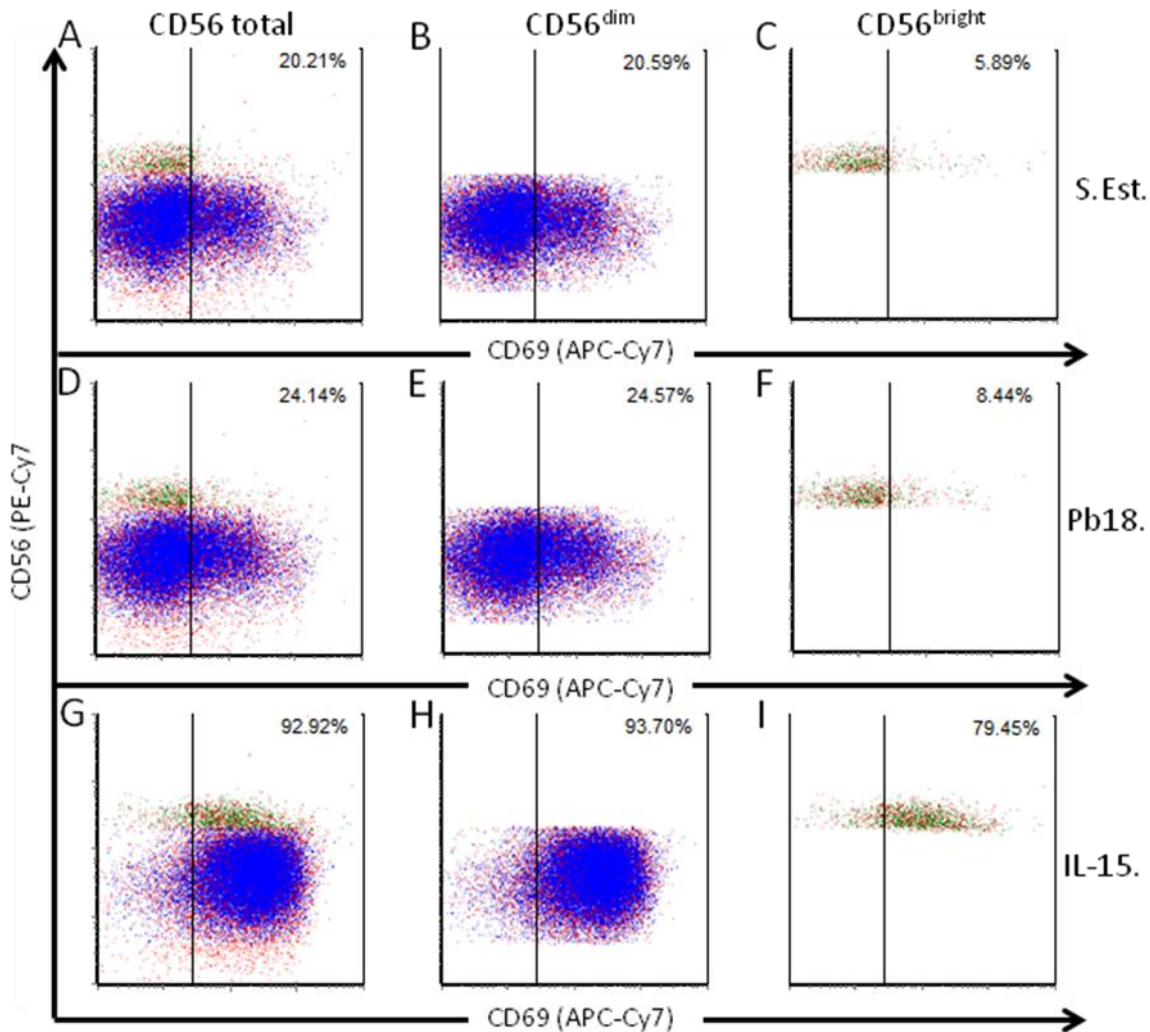


**Figura 8.11:** “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos em células CD56<sup>+</sup> estimuladas com leveduras de *P.brasiliensis* (Pb18) provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose. Granzima A (A-C), Granzima B (D-F), Perforina (G-I) e granulins (J-M) em células CD56<sup>+</sup>. Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D, G e J), células CD56<sup>dim</sup> (B, E, H e L) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F, I e M) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

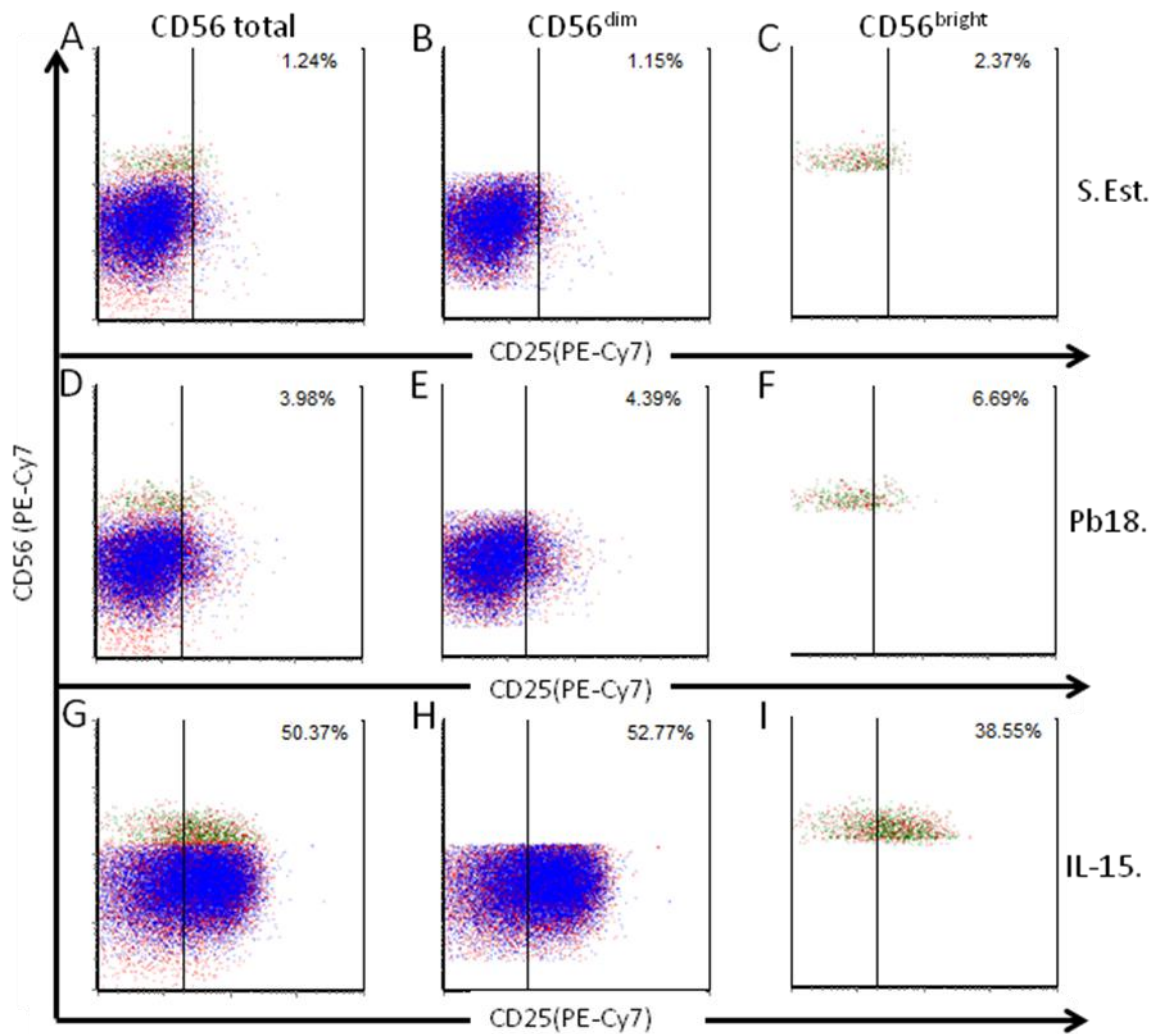


**Figura 8.12:** “Dot-plots” representativos da expressão dos constituintes dos grânulos citotóxicos em células CD56<sup>+</sup> estimuladas com IL-15 (5ng/mL) provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose. Granzima A (A-C), Granzima B (D-F), Perforina (G-I) e granulisina (J-M) em células CD56<sup>+</sup>. Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D, G e J), células CD56<sup>dim</sup> (B, E, H e L) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F, I e M) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

**8.12 “Dot-plots” representativos da expressão de marcadores de ativação (CD69 e CD25) por células CD56<sup>+</sup>**

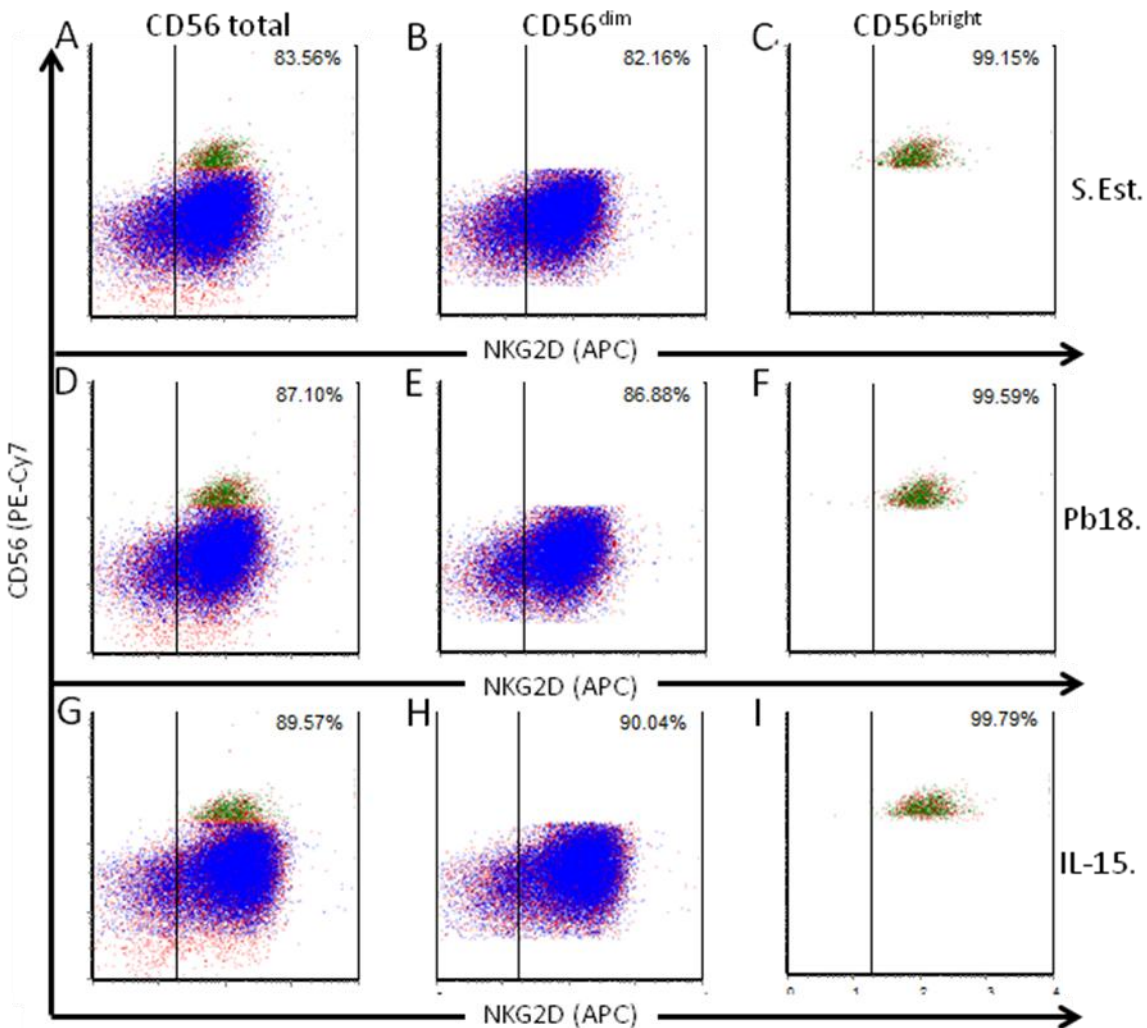


**Figura 8.13:** “Dot-plots” representativos da expressão de CD69 em células CD56<sup>+</sup> provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose não estimuladas (A-C), estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 – D-F) ou com IL-15 (5ng/mL – G-I). Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D e G), células CD56<sup>dim</sup> (B, E e H) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F e I) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.



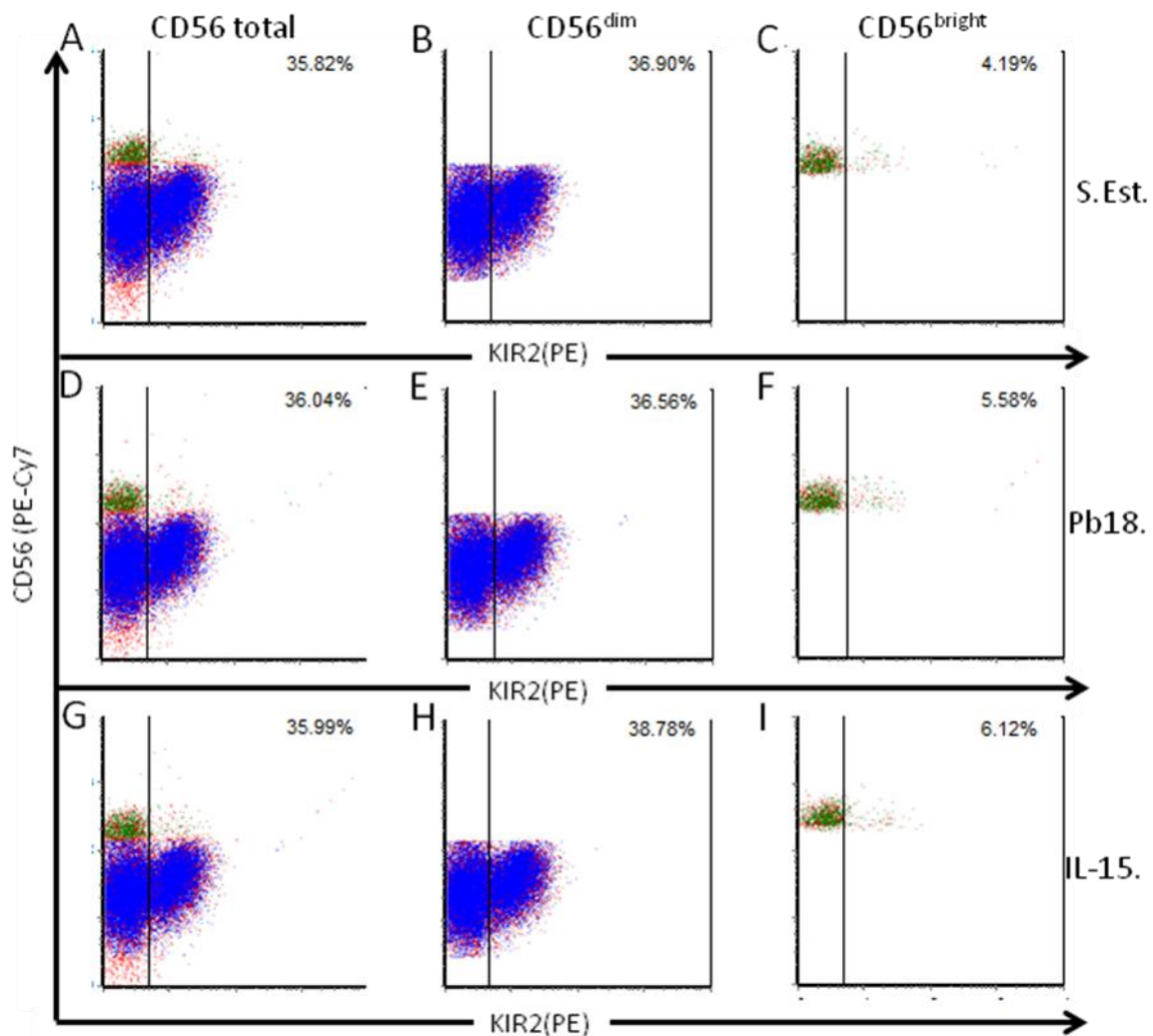
**Figura 8.14:** “Dot-plots” representativos da expressão de CD25 em células CD56<sup>+</sup> provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose não estimuladas (**A-C**), estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 – **D-F**) ou com IL-15 (5ng/mL – **G-I**). Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (**A, D e G**), células CD56<sup>dim</sup> (**B, E e H**) e células CD56<sup>bright</sup> (**C, F e I**) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

**8.13 “Dot-plots” representativos da expressão de receptores de ativação (NKG2D) e de inibição (KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1) por células CD56<sup>+</sup>**

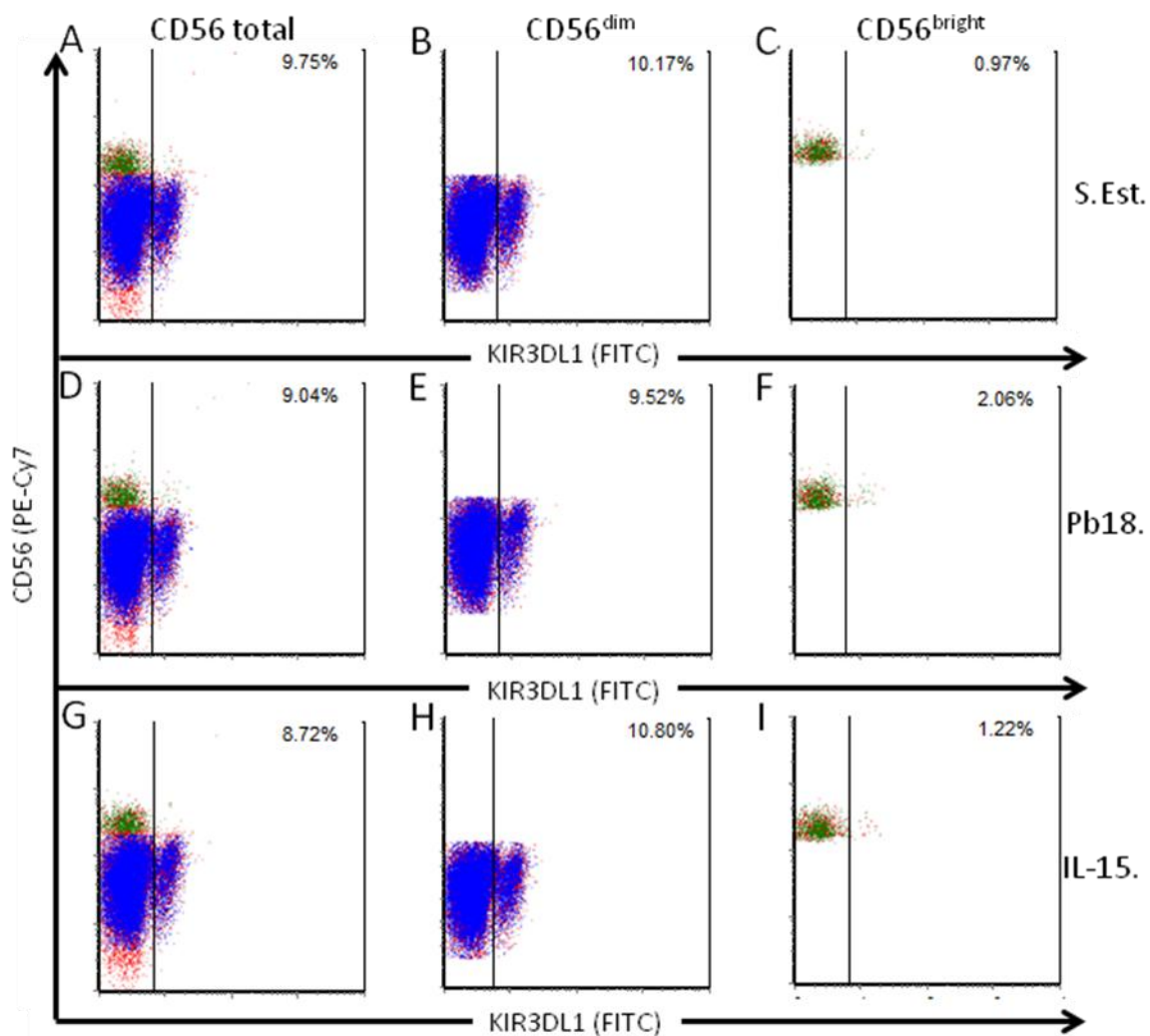


**Figura 8.15:** “Dot-plots” representativos da expressão de NKG2D em células CD56<sup>+</sup> provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose não estimuladas (A-C), estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 – D-F) ou com IL-15 (5ng/mL – G-I). Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D e G), células CD56<sup>dim</sup> (B, E e H) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F e I) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.



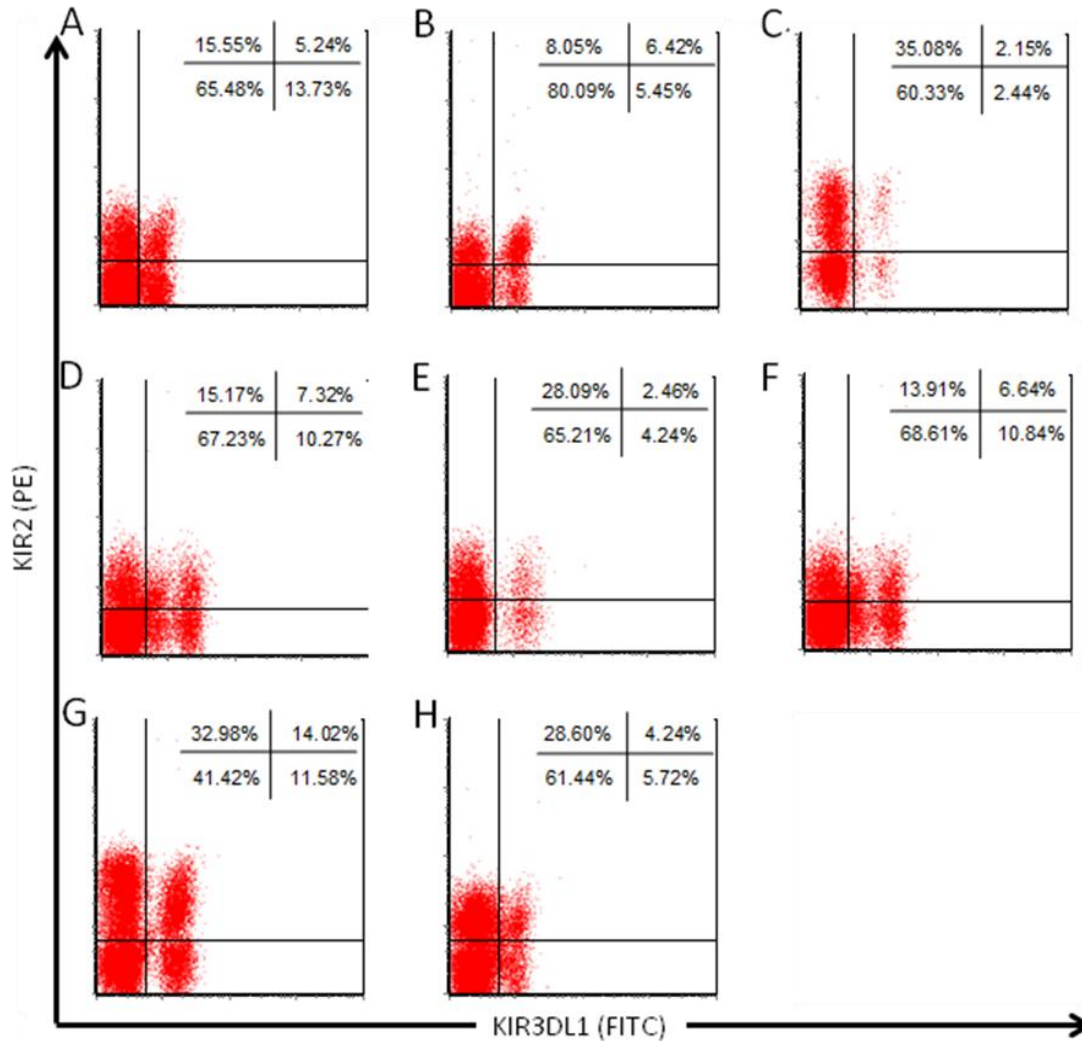


**Figura 8.16:** “Dot-plots” representativos da expressão de KIR2DL2/L3/S2 em células CD56<sup>+</sup> provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose não estimuladas (A-C), estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 – D-F) ou com IL-15 (5ng/mL – G-I). Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D e G), células CD56<sup>dim</sup> (B, E e H) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F e I) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

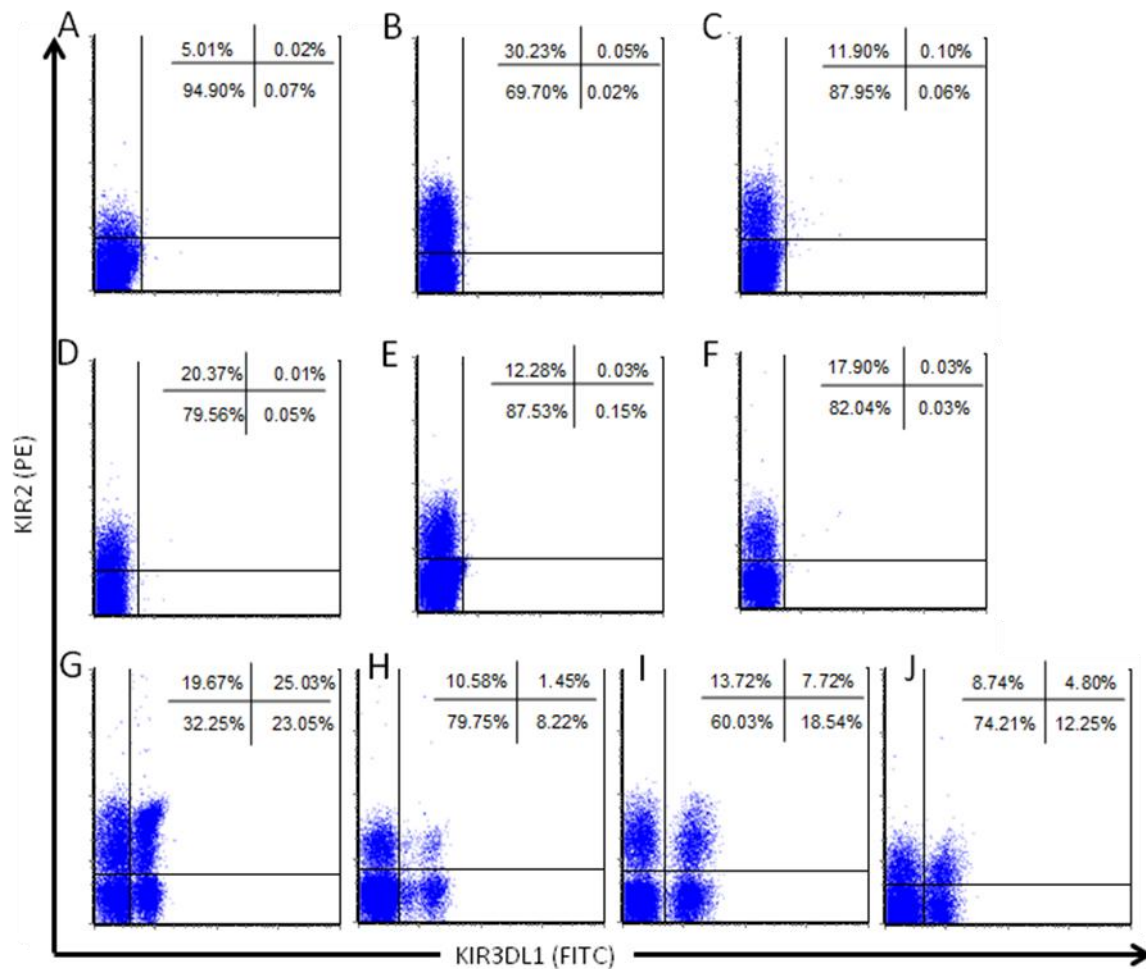


**Figura 8.17:** “Dot-plots” representativos da expressão de KIR3DL1 em células CD56<sup>+</sup> provenientes de um paciente com paracoccidiodomicose não estimuladas (A-C), estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 – D-F) ou com IL-15 (5ng/mL – G-I). Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D e G), células CD56<sup>dim</sup> (B, E e H) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F e I) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

**8.14 Expressão dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 e KIR3DL1 em células CD56<sup>+</sup> de pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos do grupo controle**

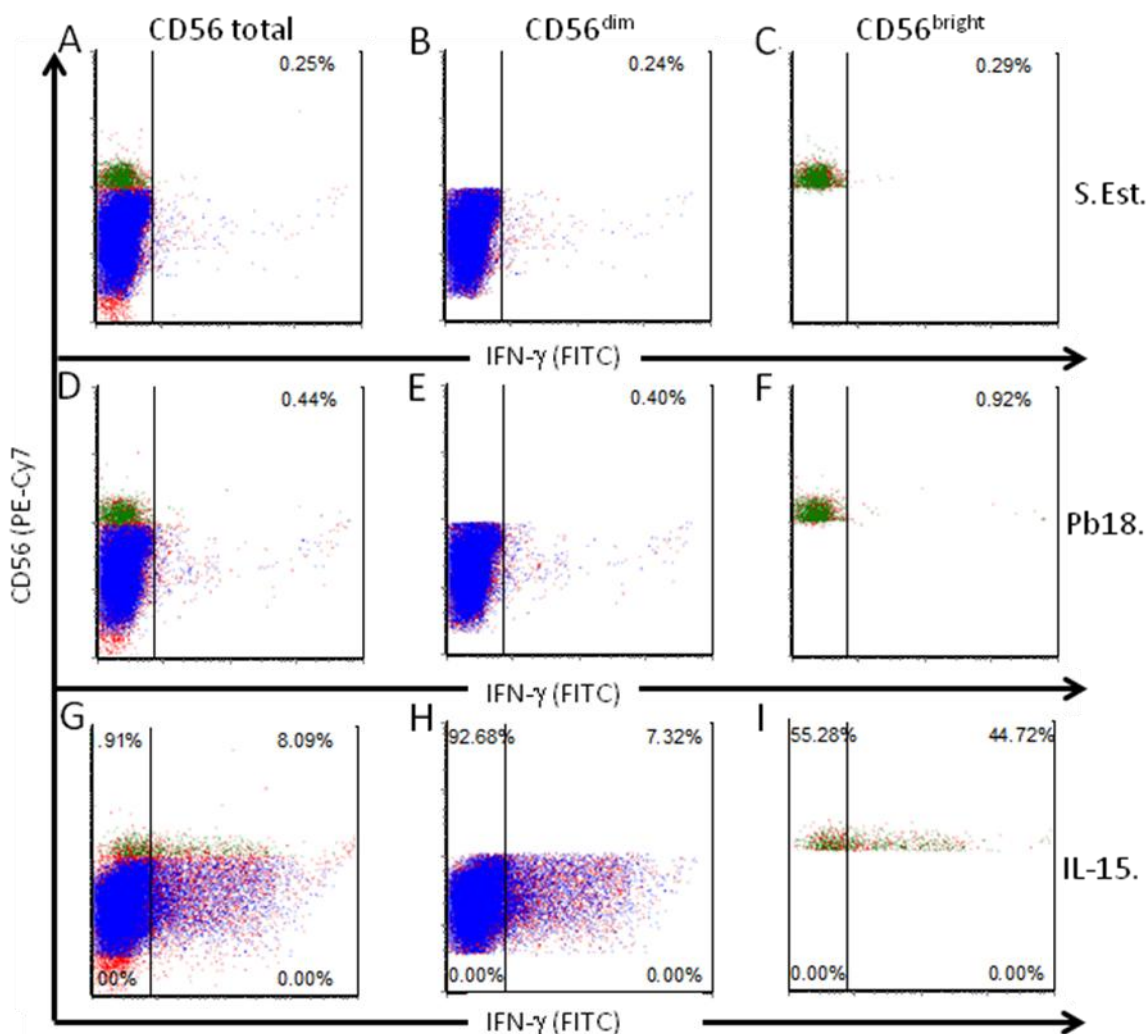


**Figura 8.18:** “Dot-plots” derivados da análise da expressão dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 (PE) e KIR3DL1 (FITC) em células CD56<sup>+</sup> não estimuladas provenientes de pacientes com paracoccidiodomicose. Os gráficos (A-H) representam os resultados obtidos de cada paciente analisado. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes. Note que apesar da variação, todos os pacientes apresentaram marcação para o receptor KIR3DL1.



**Figura 8.19:** “Dot-plots” derivados da análise da expressão dos receptores de inibição KIR2DL2/L3/S2 (PE) e KIR3DL1 (FITC) em células CD56<sup>+</sup> não estimuladas provenientes de indivíduos do grupo controle. Os gráficos (A-J) representam os resultados obtidos de cada indivíduo analisado. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes. Note somente os indivíduos representados nos gráficos de G a J, apresentaram células positivas para o receptor de inibição KIR3DL1.

### 8.15 “Dot-plots” representativos da expressão de IFN- $\gamma$ por células CD56<sup>+</sup>



**Figura 8.20:** “Dot-plots” representativos da expressão de IFN- $\gamma$  em células CD56<sup>+</sup> provenientes de um indivíduo do grupo controle, não estimuladas (A-C), estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 – D-F) ou com IL-15 (5ng/mL – G-I). Os parâmetros foram analisados em células CD56<sup>+</sup> totais (A, D e G), células CD56<sup>dim</sup> (B, E e H) e células CD56<sup>bright</sup> (C, F e I) como descrito no item 8.7. Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas nos quadrantes.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)